ISOLIERUNG UND WIRKUNGSWEISE VON L – 2,5 – DIHYDROPHENYLALANIN, EIN ANTIBIOTIKUM AUS STREPTOMYCETEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Biologie
der Eberhard–Karls–Universität zu Tübingen

vorgelegt von

URSEL FICKENSCHER

aus Köln

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543901_0092

ISOLIERUNG UND WIRKUNGSWEISE VON L-2,5-DIHYDROPHENYLALANIN, EIN ANTIBIOTIKUM AUS STREPTOMYCETEN

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Ursel Fickenscher
aus Köln

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Nov. 1970

D e k a n :	Professor Dr. D. Varjú
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter:	Professor Dr. E. Reinhard

Druck: aku-Fotodruck, 86 Bamberg, Färbergasse 8 R

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner am Institut für Biologie, Lehrbereich Mikrobiologie, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die wertvollen Anregungen und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. H. Zähner herzlich danken.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Professor Dr. W. Keller-Schierlein, ETH Zürich, für die Aufklärung der Struktur des Antibiotikums, Herrn Professor Dr. F. Lingens und Fräulein Dr. H. Uesseler, Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Universität Hohenheim, Stuttgart, für die Einarbeitung in enzymatische Methoden, Herrn Professor Dr. J. Pittard, School of Microbiology, University of Melbourne, für die Überlassung einiger Mutanten, Herrn Privatdozent Dr. W. Löffler, Institut für Biologie, Lehrbereich Mikrobiologie, der Universität Tübingen, für die Bestimmung des Streptomyceten-Stammes Tü 109 sowie allen übrigen Mitarbeitern dieses Instituts für die gute Zusammenarbeit.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	3
1. Versuchsorganismen	3
2. Chemikalien	4
3. Nährmedien und Kulturbedingungen für E. coli K 12	5
4. Plattendiffusions- und Kreuztest	6
5. Versuche mit dem Biophotometer	6
6. Fermentation des Antibiotikums	7
7. Isolierung und Charakterisierung des Antibiotikums	7
8. Gewinnung der Rohenzymextrakte	9
9. Enzymatische Tests	12
10. Herstellen von Enzymsubstraten	14
III. Versuchsergebnisse	15
1. Fermentation des Antibiotikums	15
2. Isolierung und Reinigung des Antibiotikums	16
3. Physikalische und chemische Eigenschaften des Antibiotikums	18
4. Minimale Hemmkonzentration von L-2,5-Dihydrophenylalanin und Abhängigkeit der Hemmwirkung von der Wachstumsphase	23
5. Beeinflussung der Hemmwirkung durch aromatische Aminosäuren	26
6. Test auf Kreuzresistenz zwischen L-2,5-Dihydrophenylalanin und DL-p-Fluorphenylalanin	28
7. Einfluß von L-2,5-Dihydrophenylalanin auf die Aktivität und die Synthese der DAHP-Synthetase	30
8. Einfluß von L-2,5-Dihydrophenylalanin auf die Aktivität der Chorismatmutase	37
9. Einfluß von L-2,5-Dihydrophenylalanin auf die Aktivität der Prephenatdehydratase	38
IV. Diskussion	41
V. Zusammenfassung	52
VI. Literaturverzeichnis	53

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Abkürzungen benutzt:

DAHP	3-Desoxy-D-arabino-heptulonsäure-7-phosphat
DAHP-Synthetase	Phospho-2-keto-3-desoxy-heptonat-aldolase (E. C. 4.1.2. 15)
DON	6-Diazo-5-oxo-norleucin
E-4-P	Erythrose-4-phosphat
IR	Infrarot
MNG	N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin
NAD	ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NMR	Kernmagnetische Resonanz
PEP	Phosphoenolpyruvat
Phe	L-Phenylalanin
L-2,5-H_2-Phe	L-2,5-Dihydrophenylalanin
p-F-Phe	DL-p-Fluorphenylalanin
t-RNS	Transfer-Ribonucleinsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Try	Tryptophan
Tyr	Tyrosin

I. Einleitung

Die Suche nach neuen Antibiotika - Stoffe biologischen Ursprungs, die, ohne Enzymcharakter zu besitzen, in geringen Konzentrationen Wachstumsvorgänge hemmen (ZÄHNER, 1965) - erfolgt hauptsächlich unter zwei Aspekten.

1. Die der Medizin zur Verfügung stehenden therapeutisch anwendbaren Antibiotika (WALTER und HEILMEYER, 1969) reichen für das breite Spektrum der Krankheitserreger nicht aus. Außerdem zeigen sie teilweise unerwünschte Nebenwirkungen. Deshalb ist man an Substanzen interessiert, die möglichst selektiv auf die pathogenen Keime wirken. Ferner treten seit den letzten zehn Jahren mit steigendem Prozentsatz Bakterienstämme auf, die mehrfachresistent gegen die eingesetzten Antibiotika sind (LEBEK, 1969). Erstmals wurde die Mehrfachresistenz 1957 in Japan bei Shigellen in vermehrtem Umfang vorwiegend gegen Tetracycline, Chloramphenicol, Streptomycin und Sulfonamide festgestellt (AKIBA, KOYAMA et al., 1960; OCHIAI, 1959). Wie inzwischen bekannt ist, wird sie durch R-Faktoren episomaler Natur hauptsächlich von und auf alle Species der Enterobacteriaceae übertragen (WATANABE, 1963). Eine wichtige Verbreitungsursache für Faktoren mit mehreren Resistenzgenen ist der Einsatz auch therapeutisch angewendeter Antibiotika außerhalb der Medizin, der zu einer Selektion resistenter Stämme beiträgt (BRUNNER und MACHEK, 1965; FURIA, 1968). Vorläufig kann dem Resistenzproblem nur durch die Verwendung neuer Antibiotika begegnet werden.

2. Neben der Anwendung der Antibiotika in der Medizin stellen diese Substanzen wichtige Hilfsmittel in der molekularbiologischen Forschung dar (PARTHIER, 1965; NEWTON und REYNOLDS, 1966; BUECHER und SIES, 1969). So besteht einerseits bei der Aufklärung ihrer Wirkungsweise die Möglichkeit, unbekannte Biosyntheseschritte, Stoffwechselprodukte oder auch Regulationsmechanismen in der Zelle aufzufinden. Beispiels-

weise trug das Penicillin entscheidend zu der Aufklärung der Zellwandsynthese bei grampositiven Bakterien bei (PARK, 1958). Hat ein Antibiotikum sich als selektiver Hemmstoff erwiesen, so kann andererseits unter seinem Einsatz die Bedeutung des Antibiotikum-sensitiven Prozesses für den Gesamtstoffwechsel der Zelle untersucht werden. Spezifisch gehemmt werden können die Zellatmung, der Aufbau und die Permeabilität der Zellwand und die Synthese der Nukleinsäuren und Proteine (NEWTON, 1965; GOTTLIEB und SHAW, 1967).

Bei der Suche nach Antibiotika, die in den Aminosäurestoffwechsel eingreifen, wurden zwei Actinomycetenstämme gefunden, die ein in seiner Wirkung durch Phenylalanin aufhebbares, identisches Antibiotikum bilden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, dieses Antibiotikum einerseits zu isolieren und zu charakterisieren und andererseits die Wirkungsweise zu untersuchen.

II. Material und Methoden

1. Versuchsorganismen

a) Antibiotikum-produzierende Organismen

Die beiden Actinomycetenstämme, die das unbekannte Antibiotikum ausscheiden, wurden als Streptomyces parvulus und Streptomyces arenae bestimmt. Streptomyces parvulus hat am Institut für Mikrobiologie, Tübingen, die Stammbezeichnung Tü 64 und ist bei BUZZETTI et al. (1963) beschrieben. Streptomyces arenae mit der Stammbezeichnung Tü 109 wurde aus einer Bodenprobe aus Guarujá bei Santos (Brasilien) isoliert und im Mikrobiologischen Großpraktikum 1969/70, Tübingen, unter Anleitung von Privatdozent Dr. Löffler nach HÜTTER (1967) bestimmt, wofür ihm auch an dieser Stelle gedankt sei.

b) Testorganismen

Die Versuche zur Aufklärung der Wirkungsweise wurden an Escherichia coli K 12 Stamm W 1485 (H. SAHM, Institut für Mikrobiologie, Tübingen) ausgeführt.

Für einzelne Versuche wurden außerdem folgende Bakterienstämme verwendet:

Bacillus subtilis	Stamm Tü 203 des Instituts für Mikrobiologie, Tübingen
E. coli K 12 Mutante AB 3259 (mit nur 1 Isoenzym der DAHP-Synthetase)	J. Pittard, School of Microbiology, University of Melbourne
Phenylalanin-auxotrophe Mutante von E. coli B Stamm B 78	H. Sahm s. o.
p-Fluorphenylalanin-resistente Mutanten von E. coli K 12	diese Arbeit

Die p-Fluorphenylalanin-resistenten Mutanten von E. coli K 12 wurden durch MNG-Behandlung wie bei SAHM (1970) selektioniert.

2. Chemikalien

Außer den hier aufgeführten wurden Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

a) Chemikalien für Nährmedien

Die Chemikalien für Nährmedien waren die gleichen wie bei MÜLLER (1968); außerdem wurden benutzt:

Bacto Malt Extract	Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA
Pepton aus Casein	Fa. Merck, Darmstadt
Sojamehl (vollfett) (Hensel-Erzeugnis)	Fa. Schoenenberger, Magstadt b. Stuttgart

b) Chemikalien für die in vivo Versuche

p-Aminobenzoesäure	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Bacto Casamino Acids	Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA
L-3,4-Dihydroxyphenylalanin	Serva Entwicklungslabor, Heidelberg
DL-p-Fluorphenylalanin	Fluka AG, Buchs, Schweiz
p-Hydroxybenzoesäure	EGA Chemie, Steinheim/Albuch
p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure	EGA Chemie, Steinheim/Albuch
Hyflo Super Cel	Johns-Munville, Lompoc,Calif., USA
Phenylbrenztraubensäure	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Shikimisäure	Fluka AG, Buchs, Schweiz

c) Chemikalien für die in vitro Versuche

Albumin (bovine) Cryst.	Calbiochem, Los Angeles, Cal., USA
Chorisminsäure	Prof. Lingens, Stuttgart-Hohenheim
D-Erythrose-4-phosphat Bariumsalz des Diäthylacetals	Boehringer Mannheim GmbH
NAD, freie Säure	Boehringer Mannheim GmbH
Phosphoenolpyruvat krist. mono-Natriumsalz	Boehringer Mannheim GmbH

Protaminsulfat	Serva Entwicklungslabor, Heidelberg
Streptomycinsulfat	Farbwerke Hoechst, Frankfurt

3. Nährmedien und Kulturbedingungen für E. coli K 12

a) Komplettmedium

Fleischextrakt	10 g	
Pepton	10 g	
NaCl	5 g	auf pH 7,2 eingestellt
Leitungswasser	1000 ml	

b) Minimalmedium (verändert nach DAVIS und MINGIOLI, 1950)

KH_2PO_4	3 g
K_2HPO_4	7 g
tri-Na-citrat.$2H_2O$	0,5 g
$MgSO_4.7\ H_2O$	0,1 g
$(NH_4)_2SO_4$	1 g
Glucose	5 g
Aqua deion.	1000 ml

Dem Kulturmedium der Mutante AB 3259 von E. coli K 12 wurden diejenigen Aminosäuren, für die der Stamm auxotroph ist, in einer Konzentration von 50 mg/l und 10 mg/l Thiamin zugegeben (WALLACE und PITTARD, 1969b). Für die Repressionsversuche wurden die Substanzen zu den angegebenen Zeiten der Kultur zugefügt.

Für Testplatten wurden zur Verfestigung 15 g Difco-Agar/l Nährlösung zugesetzt. Die Medien wurden 20 min. bei 120° C autoklaviert.

c) Kulturbedingungen

E. coli K 12 wurde in Submerskultur auf einer rotierenden Schüttelmaschine (120 U/min.) in 500 ml Erlenmeyerkolben mit seitlichem Einstich, die je 100 ml Medium enthielten, gezüchtet. Die Inkubationstemperatur betrug 37° C, die Inkubationsdauer 10 - 12 Stunden.

Als Impfmaterial für die Züchtung auf Minimalmedium diente eine 10 - 12 Stunden auf Komplettmedium gewachsene und zweimal mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschene Kultur. Das Wachstum wurde durch Trübungsmessung im Eppendorf-Photometer bei λ = 546 nm verfolgt. Einem Extinktionswert E_{546} = 0,1 entspricht eine Zellzahl von 10^8 Zellen/ml.

4. Plattendiffusions- und Kreuztest

a) Plattendiffusionstest

Zum Nachweis der Aktivität des Antibiotikums und zur Bestimmung seiner Konzentration mittels einer Eichkurve wurde der Plattendiffusionstest mit E. coli K 12 als Testorganismus auf definiertem Medium ausgeführt (COOPER, 1963; ZÄHNER, 1965). Das Vorbereiten der Platten erfolgte wie bei PORALLA (1967). Die Einsaatdichte in der Oberschicht betrug 4.10^7 Zellen/ml. Die Zellen wurden 10 - 12 Stunden auf Komplettmedium vorgezüchtet und zweimal mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Die Testplatten wurden bis zur Bestimmung des Hemmzonen-Durchmessers 12 - 15 Stunden bei 37° C inkubiert.

Zur Bestimmung von Phenylalanin wurden die Testplatten in gleicher Weise mit einer Phe-auxotrophen Mutante von E. coli B hergestellt und inkubiert. Hierbei wurde der Wachstumshof um die Filterrondelle ausgemessen.

b) Kreuztest

Die Beeinflussung der wachstumshemmenden Wirkung des Antibiotikums durch andere Substanzen wurde im Kreuztest untersucht (ZÄHNER et al., 1960; PORALLA, 1967). Die Vorbereitung der Testplatten erfolgte wie unter a) angegeben.

5. Versuche mit dem Biophotometer

Die Wirkung des Antibiotikums und seiner Antagonisten auf das Wachstum von E. coli in Submerskultur wurde im Biophotometer untersucht. Dieses Gerät zur automatischen Registrierung des Wachstums ist bei PORALLA (1967) beschrieben.

Die Versuche wurden bei 37° C und maximaler Frequenz und Amplitude des Magnetrührers durchgeführt. Die Küvetten wurden mit 7,5 ml einer Bakteriensuspension in Minimalmedium beschickt. Diese hatte eine Extinktion E_{546} = 0,03 gegen Nährlösung. Antibiotikum und Antagonisten wurden in 0,2 ml Wasser gelöst zu den im Ergebnisteil angegebenen Zeiten zugegeben. Die Versuchsdauer betrug maximal 20 Stunden.

6. Fermentation des Antibiotikums

a) Medium

Zur Antibiotikumproduktion wurde Streptomyces parvulus in Fermentern mit 10 l Nutzinhalt (Fa. New Brunswick Scientific Co, Inc., New Brunswick, New Jersey, USA) gezüchtet. Die Nährlösung enthielt,in Leitungswasser suspendiert,3 % vollfettes Sojamehl und 2 % Glyzerin. Der pH-Wert wurde mit 1 n KOH auf 7,5 eingestellt. Anschließend wurde die Nährlösung 30 min. bei 137° C autoklaviert.

b) Impfmaterial

Die Impfkultur (7 %) wurde auf gleichem Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben auf der oszillierenden Schüttelmaschine 3 Tage bei 27° C inkubiert.

c) Fermentationsbedingungen

Streptomyces parvulus wurde bei 27° C mit einer Rührgeschwindigkeit von 250 U/min. und einer Belüftung von 2 l/min. gezüchtet. Nach 70 - 75 Stunden war das Maximum der Substanzproduktion erreicht,und die Kultur wurde geerntet.

7. Isolierung und Charakterisierung des Antibiotikums

a) Isolierung und Reinigung

Die Kultur von Streptomyces parvulus (10 l) wurde mit 1 n HCl auf pH 4 eingestellt und unter Zusatz von 2 % Celit (Hyflo

Super Cel) abfiltriert. Das Filtrat (9,5 l) wurde mit 1 n KOH auf pH 5,5 eingestellt und dann mit Äthylacetat (5 l) extrahiert, um die lipophilen Komponenten, darunter auch das Antibiotikum Manumycin, zu entfernen (BUZZETTI et al., 1963). Die wäßrige, aktive Phase wurde nach Abdampfen des noch in ihr enthaltenen Äthylacetats 30 min. mit 3 % Aktivkohle (w/v) bei pH 8 gerührt. Nach zweimaligem Waschen der Aktivkohle mit 4 l aqua deion. wurde das Antibiotikum dreimal mit insgesamt 5 l Methanol und 0,5 n Ameisensäure (4 : 1) von der Kohle eluiert. Die vereinigten Eluate wurden im Vakuum bis zur Trockene eingeengt.

In der nun folgenden Reinigung des Rohproduktes gelang es, eine zweite, in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften sehr ähnliche, aber inaktive Substanz durch eine Craig-Verteilung (automatisch) vom Antibiotikum abzutrennen. Diese Begleitkomponente wurde dünnschichtchromatographisch und aufgrund ihres UV-Spektrums als Phenylalanin identifiziert und mit Hilfe einer Phe-auxotrophen Mutante von E. coli B im Plattendiffusionstest quantitativ bestimmt. Für die Craig-Verteilung wurden 1- 2 g Rohprodukt in 50 ml aqua deion. gelöst und über 300 Stufen zwischen n-Butanol und Wasser (1:1/ v:v) verteilt (HECKER, 1955).

Die aktiven Fraktionen 90 - 135 gaben bei der dünnschichtchromatographischen Charakterisierung in mehreren Laufmittelsystemen mit Ninhydrin einen einheitlichen orangebraunen Fleck. Die ebenfalls aktiven Fraktionen 75 - 89 enthielten neben dem Antibiotikum noch Phenylalanin und wurden zusammen mit neuem Rohprodukt weiter gereinigt. Das Antibiotikum wurde nach Einengen der sauberen Fraktionen 90 - 135 durch Umkristallisieren aus Methanol-Aceton-Äther kristallin erhalten.

b) Chromatographie

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel G Platten nach der Vorschrift von STAHL (1967) mit einer Schichtdicke

von 0,25 mm hergestellt. Die Platten wurden bei Raumtemperatur getrocknet und nicht aktiviert. Als Fließmittel wurden für Aminosäuren geeignete Systeme gewählt (PATAKI, 1966).

Papierchromatographie

Zur Papierchromatographie wurde MN 212-Papier (Machery, Nagel & Co, Düren) benutzt. Die Chromatogramme wurden in den angegegebenen Fließmitteln aufsteigend entwickelt.

Bioautographie

Zur Identifizierung des Antibiotikums auf dem Chromatogramm wurde ein Bioautogramm entwickelt. Nach papierchromatographischer Auftrennung des Substanzgemisches im Laufmittelsystem n-Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 2 wurde das getrocknete Chromatogramm in Streifen zerschnitten auf eine Testplatte mit E. coli K 12 aufgelegt. Nach 12-stündiger Inkubation bei 37° C konnte der R_f-Wert anhand der Hemmzone auf der Testplatte bestimmt werden.

Sprühreagenzien

Zur Einordnung des Antibiotikums in eine Substanzklasse wurden die entwickelten Dünnschichtchromatogramme mit verschiedenen Nachweisreagenzien besprüht. Die im Ergebnisteil angegebenen Reagenzien sind bei STAHL (1967) unter Sprühreagenzien aufgeführt.

c) Spektren

Das UV-Absorptionsspektrum wurde in Feinsprit, das IR-Absorptionsspektrum in KBr (auf einem Perkin-Elmer-Spektrographen, Modell 21), das NMR-Spektrum in D_2O (auf einem Varian-Spektrographen, Modell A 60 bzw. Modell HA 100) aufgenommen.

8. Gewinnung der Rohenzymextrakte

a) Zellaufschluß

E. coli K 12 wurde, wie schon unter Punkt 3c) beschrieben, auf definiertem Medium gezüchtet und in der log-Phase bei

Extinktion von E_{546} = 0,8 geerntet.

Alle nun folgenden Schritte wurden bei einer Temperatur zwischen 0° C und 4° C ausgeführt (variiert nach SPRINSON, SRINIVASON et al., 1962; DOY und BROWN, 1965; STAUB und DENES, 1969a). Die Zellen wurden 30 min. bei 19400 g abzentrifugiert und zweimal mit eisgekühltem 0,025 molarem KH_2PO_4-NaOH-Puffer pH 7,2 gewaschen. Für den Zellaufschluß wurden die Zellen in demselben Puffer suspendiert (0,5 - 1,0 g Naßgewicht/7,5 ml Puffer) und insgesamt 2 min. mit dem Ultraschallgerät S-125 (Fa. Branson Instruments, Inc., Stanford, Conn., USA) bei Stufe 3 beschallt. Die Zelltrümmer und nicht aufgeschlossenen Zellen wurden bei 40000 g 30 min. in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde zweimal eine Stunde gegen 0,025 molaren KH_2PO_4-NaOH-Puffer pH 7,2 dialysiert.

b) Protaminsulfatfällung

Der dialysierte Rohextrakt wurde unter langsamen Rühren mit einer 2 %igen neutralen Protaminsulfat-Lösung (1 ml/140 mg Protein) versetzt, um die Nucleinsäuren weitgehend abzutrennen. Nach 3-stündigem Stehen in der Kälte wurden die ausgefallenen Nucleinsäuren 30 min. bei 49000 g abzentrifugiert und der Überstand einer Ammoniumsulfatfällung unterworfen.

c) Ammoniumsulfatfällung

Zum Überstand der Protaminsulfatfällung wurden steigende Mengen feinst pulverisierten Ammoniumsulfats langsam unter Rühren zugegeben (BAILEY, 1967). Nach Erreichen der jeweils gewünschten Konzentrationsstufe wurde die Lösung noch vorsichtig 20 min. gerührt und dann der Niederschlag 30 min. bei 40000 g abzentrifugiert. Die ausgefallenen Proteinfraktionen wurden jeweils in 10 ml 0,025 molaren KH_2PO_4-NaOH-Puffer pH 7,2 aufgenommen und zweimal eine Stunde gegen denselben Puffer dialysiert.

Für die meisten Enzymversuche wurden die dialysierten Ammoniumsulfatfraktionen mit der jeweils größten spezifischen Akti-

vität eingesetzt. Das Phe-sensitive Isoenzym der DAHP-Synthetase wurde noch durch eine Acetonfällung gereinigt (Tab.1).

Tabelle 1: Reinigung der DAHP-Synthetase aus E. coli K 12

Reinigungsschritt	Vol. (ml)	Gesamt-protein (mg)	Gesamt-aktivität	spez. Aktivität
Rohextrakt	100	580	2880	5
Protaminsulfat-fällung	100	540	2880	5,3
Ammoniumsulfat-fällung	10	145	2300	16
Acetonfällung	4	14	1270	83

d) Acetonfällung

Die Ammoniumsulfatfraktion mit der größten spezifischen DAHP-Synthetase-Aktivität (10 ml) wurde in eine Eis-Kochsalz-Mischung von -3° bis -5° C gestellt und langsam unter Rühren mit 10 ml Aceton (-15° C) versetzt. Der inaktive Niederschlag wurde bei -10° C bei 18000 g abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde wieder mit 9 ml Aceton (-15° C) versetzt. Das ausgefallene Enzym wurde in 4 ml 0,05 molarem KH_2PO_4-NaOH-Puffer aufgenommen. Wie ein Aktivitätstest ergab, ist das ausgefallene Enzym nur durch Phenylalanin hemmbar.

Die Enzymlösungen wurden entweder sofort getestet oder bei -15° C eingefroren. Durch das Einfrieren, selbst über mehrere Wochen hinweg, war kein Aktivitätsverlust festzustellen.

Gereinigte Chorismatmutase aus Claviceps paspali wurde freundlicherweise von Professor Lingens, Stuttgart-Hohenheim, zur Verfügung gestellt.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach LOWRY et al.(1951). Als Eichsubstanz diente kristallines Serumalbumin vom Rind. Das

Verhältnis von Protein zu Nucleinsäuren wurde nach der Methode von WARBURG und CHRISTAN (1941) bestimmt (LAYNE, 1957).

9. Enzymatische Tests

a) DAHP-Synthetase

Die DAHP-Synthetase katalysiert die Kondensation von Erythrose-4-phosphat (E-4-P) und Phosphoenolpyruvat (PEP) zu 3-Desoxy-D-arabino-heptulonsäure-7-phosphat (DAHP). Die Bestimmung des DAHP beruht auf der Umsetzung eines Spaltproduktes dieser Verbindung mit Thiobarbitursäure zu einem Farbstoff. Dieser hat bei λ = 549 nm ein Absorptionsmaximum (SRINIVASON und SPRINSON, 1959). Für die Berechnung der Konzentration an DAHP wurde nach BROWN (1968) ein Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{549} = 5{,}3 \cdot 10^4$ eingesetzt.

Im Inkubationsansatz waren, wenn nicht anders angegeben, 25 µMol KH_2PO_4-NaOH-Puffer pH 7,2, 0,5 µMol E-4-P, 0,5 µMol PEP und eine die Reaktion begrenzende Enzymmenge in einem Gesamtvolumen von 1 ml enthalten. Nach 10 min. Inkubation bei 37° C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,2 ml 10 %iger Trichloressigsäure gestoppt und die ausgefallenen Proteine abzentrifugiert (DOY und BROWN, 1965).

Der Nachweis des gebildeten DAHP im Überstand erfolgte nach der von BROWN und DOY (1965) modifizierten Vorschrift von SRINIVASON und SPRINSON (1959). Die in dieser Arbeit erwähnte störende Trübung, die bei der Bestimmung des DAHP auftreten kann, wird dadurch vermieden, daß man die zu messenden Lösungen nach dem Kochen bis zur Messung in ein Wasserbad von 37° C stellt.

Eine DAHP-Synthetase-Einheit ist die Enzymmenge, die 1,0 mµMol DAHP in einer Minute bildet. Die spezifische Aktivität wird in Enzymeinheiten/mg Protein ausgedrückt (STAUB und DENES, 1969a).

b) Chorismatmutase

Die Chorismatmutase katalysiert die Umwandlung von Chorisminsäure in Prephensäure. Diese wurde nach COTTON und GIBSON (1965) durch Umwandlung in Phenylbrenztraubensäure bestimmt. Phenylbrenztraubensäure hat im alkalischen Milieu bei 320 nm ein Absorptionsmaximum. Für die Umrechnung auf molaren Umsatz wurde ein molarer Extinktionskoeffizient ε_{320} = 17 500 verwendet.

Im Inkubationsansatz waren in einem Gesamtvolumen von 1 ml 0,4 µMol Chorisminsäure, 20 µMol Tris-HCl-Puffer pH 8,2 und meistens eine die Reaktion begrenzende Menge an Enzymlösung enthalten. Die Inhibitoren wurden in der angegebenen Konzentration zugesetzt. Nach 30 min. Inkubation bei 30° C wurden 0,5 ml 1 n HCl zugegeben und für die Umwandlung in Phenylbrenztraubensäure nochmals 10 min. bei 30° C inkubiert. Zur Messung der Absorption bei λ = 320 nm wurden 3 ml 1 n KOH zugesetzt.

Eine Chorismatmutase-Einheit ist die Enzymmenge, die die Bildung von 1,0 mµMol Prephensäure in 1 min. katalysiert. Die spezifische Aktivität wird in Enzymeinheiten/mg Protein angegeben.

c) Prephenatdehydratase

Die Prephenatdehydratase katalysiert die Umwandlung von Prephensäure in Phenylbrenztraubensäure. Deren Bestimmung erfolgt analog wie bei der Chorismatmutase (COTTON und GIBSON, 1965). Im Inkubationsansatz waren in einem Gesamtvolumen von 1 ml 0,5 µMol Prephensäure, 25 µMol Tris-HCl-Puffer pH 8,2 und eine die Reaktion begrenzende Enzymmenge enthalten. Die Inhibitoren wurden in der angegebenen Konzentration zugegeben. Nach 30 min. Inkubation bei 30° C wurden 3 ml 1 n NaOH zugesetzt und die Extinktion bei 320 nm bestimmt.

Eine Prephenatdehydratase-Einheit ist die Enzymmenge, die die Bildung von 1,0 mµMol Phenylbrenztraubensäure in 1 min.

katalysiert. Die spezifische Aktivität wird in Enzymeinheiten/mg Protein angegeben.

10. Herstellen von Enzymsubstraten

D-Erythrose-4-phosphat wurde nach der Vorschrift von BALLOU, FISCHER et al. (1955) durch Hydrolyse des Bariumsalzes des Erythrose-4-phosphat-diäthylacetals hergestellt und bei -15° C aufbewahrt.

Chorisminsäure wurde freundlicherweise von Prof. Lingens, Stuttgart-Hohenheim, zur Verfügung gestellt. Sie wurde dort, wie bei SPRÖSSLER und LINGENS (1970) beschrieben, aus dem Akkumulationsmedium der Aerobacter-aerogenes-Mutante 62-1 gewonnen. Die Konzentration wurde aus dem Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{274} = 2700$ berechnet (GIBSON, 1964).

Prephensäure wurde, variiert nach GIBSON (1964), durch Erwärmen von Chorisminsäure gewonnen. Hierzu wurde die Chorisminsäure in 100 mM KH_2PO_4-NaOH-Puffer pH 8,0 gelöst und 15 min. bei 70° C erwärmt. Die Konzentration der Prephensäure wurde nach der Methode von COTTON und GIBSON (1965) ermittelt.

III. Versuchsergebnisse

1. Fermentation des Antibiotikums

Die Fermentationsbedingungen für eine maximale Antibiotikumproduktion durch Streptomyces parvulus (Stamm Tü 64) wurden bereits unter Material und Methoden beschrieben. Durch einen Vergleich der biologischen Aktivität sowie der physikalisch-chemischen Eigenschaften konnte gezeigt werden, daß ein weiterer Streptomycet, Streptomyces arenae (Stamm Tü 109), dasselbe Antibiotikum produziert. Tabelle 2 zeigt für beide Stämme die Abhängigkeit der Antibiotikumbildung von der Inkubationsdauer. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt, in der der Hemmzonendurchmesser beim Plattendiffusionstest mit E. coli K 12 in Abhängigkeit von der Antibiotikumkonzentration aufgetragen ist (Abb. 6).

Tabelle 2: Abhängigkeit der Konzentration des Antibiotikums in der Kultur von Tü 64 und Tü 109 von der Inkubationsdauer (Kolbenversuch)

Zeit	Tü 64 Konz. mg/ml	Tü 109 Konz. mg/ml
1. Tag	-	<0,1
2. Tag	<0,1	<0,1
3. Tag	0,7	0,4
4. Tag	1,4	3,7
5. Tag	3,7	3,1
6. Tag	<0,1	0,3

Bei Züchtung im 10 l-Fermenter stellte sich das Maximum der Antibiotikum-Produktion infolge günstigerer Fermentationsbedingungen wie höhere Impfmenge und bessere Belüftung schon nach drei Tagen ein. Allerdings wurde die hohe Ausbeute, wie

sie im Kolben vorliegt, nicht erreicht. Sie betrug bei Streptomyces parvulus 2 mg/ml und bei Streptomyces arenae 2,7 mg/ml.

2. Isolierung und Reinigung des Antibiotikums

Die Isolierung und Reinigung des Antibiotikums aus der Kultur von Streptomyces parvulus ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Außerdem ist die mit Hilfe einer Eichkurve (Abb. 6) ermittelte Ausbeute nach jedem Reinigungsschritt, bezogen auf die Ausgangskonzentration in der Kultur, in Prozent angegeben.

a) Isolierung

Vor der Abtrennung des Mycels von der Kultur wurde diese auf pH 4 eingestellt, um bei der Filtration gleichzeitig die bei diesem pH-Wert aus der Nährlösung ausgefallenen Proteine von der Kulturflüssigkeit abzutrennen. Das Antibiotikum ist im Kulturfiltrat dünnschicht-chromatographisch nachweisbar (Tab. 3). Der im Bioautogramm ermittelte aktive Fleck ergibt mit Ninhydrin eine spezifische orangebraune Färbung. Extraktionsversuche mit dem Kulturfiltrat ergaben, daß das Antibiotikum nicht mit Aceton, Äthylacetat, Chloroform, Äther und Tetrachlorkohlenstoff, sondern nur mit Butanol extrahierbar ist. Aufgrund seines hydrophilen Charakters konnten die lipophilen Komponenten durch Extraktion mit Äthylacetat abgetrennt werden. Vor dem Ausschütteln wurde das Filtrat auf pH 5,5 eingestellt, da bei diesem pH-Wert ein weiteres Antibiotikum, das Manumycin, vollständig in die organische Phase übergeht (BUZZETTI et al., 1963).

Die Isolierung des Antibiotikums aus dem Kulturfiltrat gelang durch Adsorption an Aktivkohle und anschließende Eluierung mit einem Methanol-Ameisensäure-Gemisch. Wie eine Aktivitätsbestimmung zeigte, wird die aktive Substanz bei pH 8 quantitativ an die Aktivkohle gebunden, während im inaktiven Durchlauf weitgehend die Zuckerkomponenten aus der Nährlösung enthalten sind. Bei der Eluierung wurden 50 % des gebundenen Antibiotikums zurückgewonnen. Eine dünnschicht-

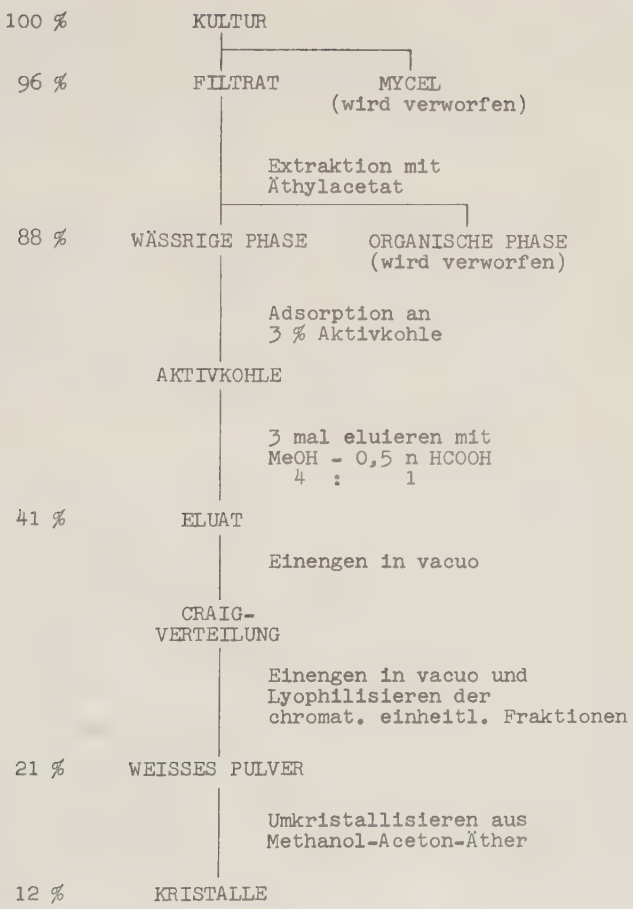

Abb. 1: Schema für die Aufarbeitung des Antibiotikums.
Die Ausbeute ist, bezogen auf die Ausgangskonzentration in der Kultur, in Prozent angegeben.

chromatographische Charakterisierung des Eluats ergab, daß neben dem Antibiotikum noch eine zweite ninhydrinpositive Substanz, die in ihrem R_f-Wert nur wenig von dem der aktiven Substanz differiert (Tab. 3), vorhanden ist. Diese Begleitkomponente wurde als Phenylalanin identifiziert.

b) Reinigung

Im folgenden Reinigungsschritt gelang es, das in seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften sehr ähnliche Phenylalanin vom Antibiotikum abzutrennen. Aufgrund ihrer verschiedenen Verteilungskoeffizienten im Lösungsmittelsystem Butanol-Wasser (1 : 1) wurde eine weitgehende Auftrennung beider Substanzen in diesem System durch eine Craig-Verteilung über 300 Stufen erreicht.

Bei Einsatz von 1,2 g Rohprodukt waren in den Fraktionen 90 - 135 376 mg Antibiotikum enthalten, das bei der Dünnschichtchromatographie in mehreren Laufmittelsystemen mit Ninhydrin einen einheitlichen orangebraunen Fleck gab (Tab. 3). Die ebenfalls aktiven Fraktionen 75 - 89 (346 mg) enthielten neben der aktiven Substanz noch Phenylalanin. Die einheitlichen Fraktionen 90 - 135 ergaben beim Umkristallisieren aus Methanol-Aceton 230 mg farblose Kristalle.

Abb. 2 zeigt die Abtrennung des Antibiotikums von Phenylalanin nach einer Craig-Verteilung über 70 Stufen sowie die Konzentrationen beider Substanzen in der Ober- und Unterphase. Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, verteilt sich das Antibiotikum zwischen Ober- und Unterphase im Verhältnis 1 : 2.

3. Physikalische und chemische Eigenschaften des Antibiotikums

Zur Charakterisierung des Antibiotikums wurden die üblichen physikalischen und chemischen Eigenschaften ermittelt.

Das Antibiotikum kristallisiert aus Aceton-Äther in farb-

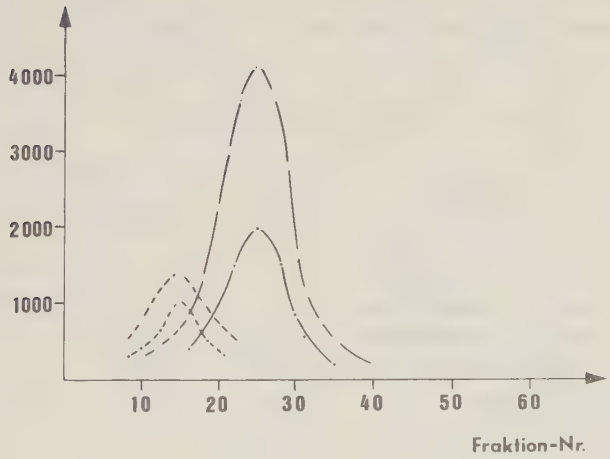

Abb. 2: Craig-Verteilung mit 4 g Rohprodukt (Kohle-Eluat) über 70 Stufen zwischen n-Butanol-Wasser (1:1/v:v)

losen Kristallen, die bei 205° C unter Zersetzung schmelzen. Es löst sich sehr gut in Wasser, gut in Methanol und Äthanol, mäßig in Butanol; in Aceton, Äthylacetat, Chloroform, Äther und Tetrachlorkohlenstoff ist es, wie schon die Extraktionsversuche zeigten, unlöslich. In wäßriger Lösung ist es über einen weiten pH-Bereich (pH 2 - 9) stabil. Allerdings unterliegt es selbst in fester Form bei längerem Lagern (nach 2 - 3 Monaten) auch bei -15° C einer chemischen Umwandlung durch Dehydrierung.

Das Antibiotikum zeigt eine positive Ninhydrin-Reaktion, dagegen reagiert es negativ mit Naphthoresorcin, Elson-Morgan-Reagenz, 2,4-Dinitrophenylhydrazin, Eisen-III-chlorid, Folin-Ciocalteaus-Reagenz, Fehling- und Millon-Reagenz (STAHL, 1967). Mit Ninhydrin gibt es auf Papier oder Kieselgel eine intensiv

orangebraune Farbreaktion. Mit Hilfe dieser Identifizierungsmöglichkeit wurde die Einheitlichkeit des Fleckes in mehreren Laufmittelsystemen getestet. Die R_f-Werte sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3: Chromatographie des Antibiotikums

Laufmittel	R_f-Wert
Dünnschichtchromatographie	
1. n-Butanol-Eisessig-Wasser 4 : 1 : 5	0.54
2. n-Butanol-Eisessig-Wasser 4 : 1 : 2	0.57
3. sec. Butanol-Ameisensäure-Wasser 7 : 1 : 2	0.47
4. Eisessig-Wasser 1 : 20	0.74
5. Aceton-Methanol-Wasser 4 : 5 : 1	0.52
Papierchromatographie	
6. n-Butanol-Eisessig-Wasser 4 : 1 : 2	0.71

Die Strukturaufklärung, die Prof. Dr. Keller-Schierlein vom Laboratorium für organische Chemie der E. T. H. in Zürich ausführte - ihm sei auch an dieser Stelle für die Überlassung der Daten gedankt - erfolgte vorwiegend spektroskopisch.

Das UV-Absorptionsspektrum hat keine charakteristischen Banden, bei 210 nm zeigt es Endabsorption. In Abbildung 3 ist das IR-Absorptionsspektrum und in Abbildung 4 das NMR-Spektrum wiedergegeben.

Die spezifische Drehung des Antibiotikums beträgt $[\alpha]_D$ = 62,9° (c = 0,286 in Wasser) und -36,8° (c = 0,143 in 6 n HCl). Die elektrometrische Titration mit Tetramethylammoniumhydroxid in 80 proz. Methylcellosolve lieferte eine einzige Titrationsstufe mit dem pK^*_{MCS} = 9,80.

Abb. 3: IR-Absorptionsspektrum von L-2,5-Dihydrophenylalanin in KBr

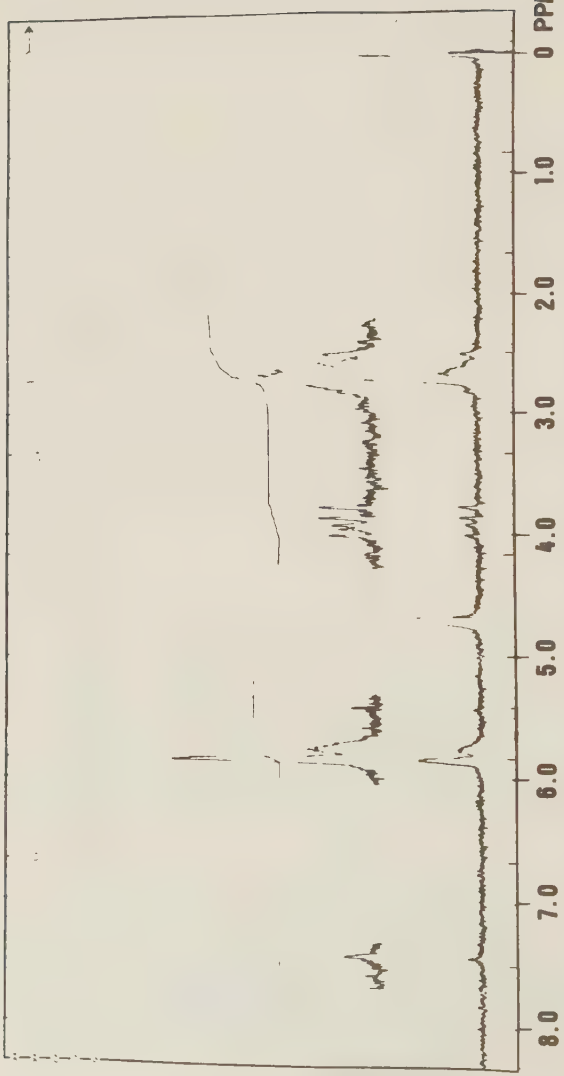

Abb. 4: NMR-Spektrum von L-2,5-Dihydrophenylalanin in D_2O

Aus den Mikroanalysen ergibt sich die Bruttoformel $C_9H_{13}O_2N$, mit der auch das Massenspektrum (M^+ = 167) übereinstimmt.

Aufgrund der angeführten Eigenschaften und Reaktionen sowie der spezifischen Drehung eines Derivates und des Drehungsunterschiedes des Antibiotikums in saurer und neutraler Lösung handelt es sich um die Aminosäure L-2,5-Dihydrophenylalanin.

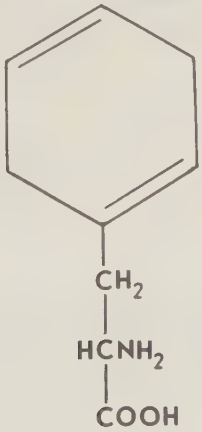

Abb. 5: Struktur des Antibiotikums

Nachdem die Struktur des Antibiotikums aufgeklärt worden war, konnte festgestellt werden, daß diese Substanz durch SNOW et al. (1968) synthetisch aus Phenylalanin dargestellt wurde.

4. Minimale Hemmkonzentration von L-2,5-Dihydrophenylalanin und Abhängigkeit der Hemmwirkung von der Wachstumsphase

a) Minimale Hemmkonzentration

Zu Beginn der Untersuchungen über die Wirkungsweise von L-2,5-Dihydrophenylalanin (L-2,5-H_2-Phe) auf E. coli K 12 wurde die minimale Konzentration ermittelt, die noch wachstumshemmend wirkt.

Wie beim Auffinden des Antibiotikums schon festgestellt worden war, zeigt es im Plattendiffusionstest auf Komplett-Medium keine Hemmwirkung,und auch auf definiertem Medium bewirkt es keine völlig klaren Hemmhöfe. In der Eichkurve Abb. 6 ist der dekadische Logarithmus der Konzentration der Antibiotikum-Lösung, in der die Rondelle getränkt wurde, gegen den Hemmzonendurchmesser bei E. coli K 12-Platten und vergleichend bei B. subtilis-Platten aufgetragen. Die untere Nachweisgrenze für einen Hemmhof liegt bei 0,1 mg Antibiotikum/ml.

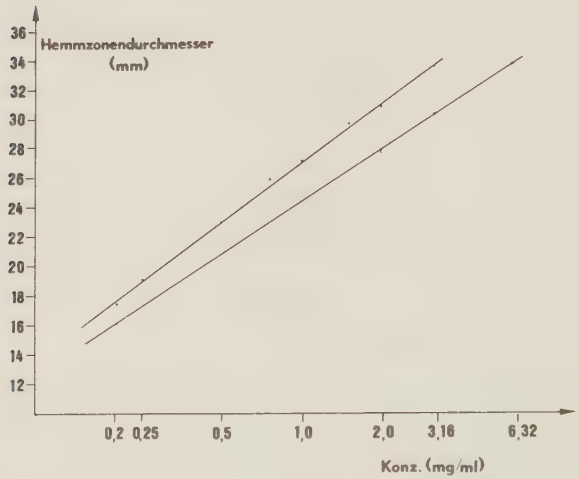

Abb. 6: Abhängigkeit des Hemmzonendurchmessers von der L-2,5-Dihydrophenylalanin-Konzentration (Plattendiffusionstest)
•——• für E. coli K 12; o——— o für B. subtilis

Durch Zugabe des Antibiotikums in verschiedenen Konzentrationen zu einer Submerskultur von E. coli K 12 in Minimalmedium wurde die minimale Hemmkonzentration ermittelt. Abbildung 7 zeigt den Verlauf der Wachstumskurven im Biophotometer bei steigenden Antibiotikum-Konzentrationen. Dieses

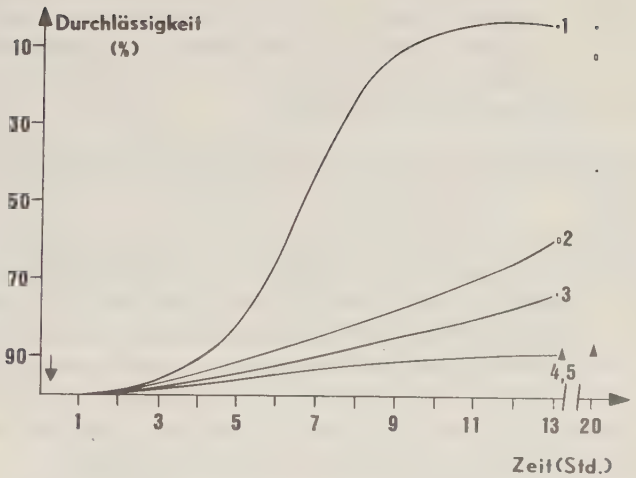

Abb. 7: Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration von L-2,5-Dihydrophenylalanin bei E. coli K 12 in definiertem Medium (Biophotometer-Versuch)
1: Kontrolle; 2: 2 γ L-2,5-H_2-Phe/ml; 3: 4 γ/ml;
4: 8,35 γ/ml (= $5 \cdot 10^{-5}$ m); 5: 16,7 γ/ml (= 10^{-4} m)

wurde zu Beginn der Inkubation zugegeben. Wie aus den Kurven ersichtlich ist, liegt die minimale Hemmkonzentration um 8,35 γ/ml ($5 \cdot 10^{-5}$ molar). Bei Konzentrationen, die unterhalb dieses Wertes liegen, beobachtet man nur eine Wachstumsverzögerung.

b) Abhängigkeit der Hemmwirkung von der Wachstumsphase

Ebenfalls in Biophotometer-Versuchen wurde die Abhängigkeit der Hemmwirkung durch L-2,5-H_2-Phe von der Wachstumsphase, in der sich die Kultur befindet, untersucht.

Es zeigte sich, daß das Antibiotikum nur wachstumshemmend wirkt, wenn es in der lag-Phase zugesetzt wird. Bei Zugabe von L-2,5-H_2-Phe zu E. coli-Kulturen, die sich in der frühen,

mittleren oder späten exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurde sowohl bei der Konzentration, die in der lag-Phase hemmt, als auch bei einer der höheren Populationsdichte angeglichenen Konzentration (bis zu 167 γ/ml) kein Einfluß auf das Wachstum festgestellt.

5. Beeinflussung der Hemmwirkung durch aromatische Aminosäuren

Wie erwähnt, wirkt L-2,5-H_2-Phe im Plattendiffusionstest auf Komplettmedium nicht wachstumshemmend. Daher war anzunehmen, daß in diesem Medium ein oder mehrere Stoffe enthalten sind, die die Hemmwirkung des Antibiotikums aufheben. Auch beim Test des Kulturfiltrats von Streptomyces parvulus auf Aktivität war innerhalb der Hemmzone um die Filterrondelle ein Wachstumshof zu sehen, der ebenfalls auf eine antagonisierende Substanz in der Nährlösung hinwies.

Tab. 4: Beeinflussung der Hemmwirkung von L-2,5-Dihydrophenylalanin (2 mg/ml) auf E. coli K 12 durch Zwischen- und Endprodukte der Biosynthese aromatischer Aminosäuren und der Vitamine (2 mg/ml und 5 mg/ml)

Substanz	Aufhebung
Shikimisäure	keine
Chorisminsäure	keine
Anthranilsäure	keine
Indol	keine
Tryptophan	keine
p-Aminobenzoesäure	keine
p-Hydroxybenzoesäure	keine
Prephensäure	keine
Phenylbrenztraubensäure	keine
p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure	keine
L-Phenylalanin	unkompetitiv
L-Tyrosin	kompetitiv

Im Kreuztest konnte eine Aufhebung der wachstumshemmenden Wirkung durch Casamino acids festgestellt werden. Dies deutete darauf hin, daß der Antagonist eine Aminosäure ist. Deshalb wurden die 20 biogenen Aminosäuren einzeln getestet. Dabei zeigte sich, daß L-Phenylalanin die Hemmwirkung unkompetitiv und L-Tyrosin kompetitiv aufhebt (Tab. 4). Wie aus Tabelle 4 noch hervorgeht, können die Zwischenprodukte der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren und der Vitamine die Hemmwirkung nicht aufheben. Es muß hier aber berücksichtigt werden, daß Chorisminsäure von der Zelle nur äußerst schlecht aufgenommen werden kann und ebenso wie die Prephensäure sehr instabil ist (GIBSON und GIBSON, 1964).

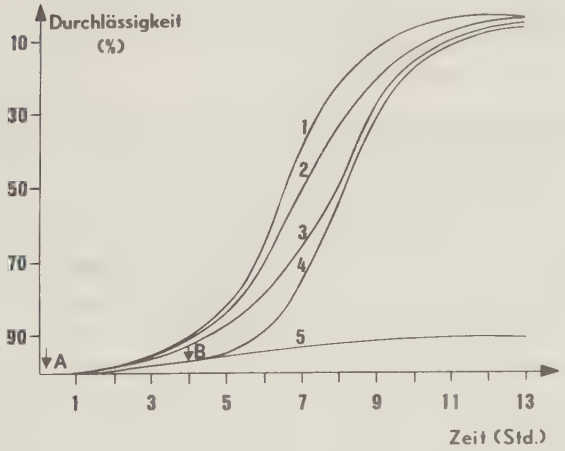

Abb. 8: Aufhebung der Hemmwirkung von L-2,5-Dihydrophenylalanin durch L-Phenylalanin und L-Tyrosin bei E. coli K 12
10 γ L-2,5-H_2-Phe/ml bei 2, 3, 4 und 5 (zugesetzt bei A)
1: Kontrolle; 2: 1 γ Phe/ml; 3: 10,5 γ Tyr/ml (zugesetzt bei A); 4: 1 γ Phe/ml (zugesetzt bei B)

Abbildung 8 zeigt die Aufhebung der Wachstumshemmung durch L-Phenylalanin und L-Tyrosin im Biophotometer.

Dabei ergibt sich für L-Phenylalanin ein Inhibitionsindex von 10 und für L-Tyrosin von 1. Dieser Index ist nach WOOLLEY (1952) definiert als das Verhältnis der Konzentrationen von Antimetabolit und Metabolit, bei dem ein Wachstum des Testorganismus gerade noch möglich ist. Bei Konzentrationen, die unterhalb der in Abbildung 8 für Phenylalanin und Tyrosin angegebenen liegen, wurde keine Aufhebung beobachtet. Die Aufhebung durch Phenylalanin ist also wesentlich spezifischer als die durch Tyrosin.

Weiterhin geht aus Abbildung 8 hervor, daß die Wachstumshemmung durch L-2,5-H_2-Phe reversibel ist. Gibt man 4 Stunden nach Antibiotikumgabe (10 γ/ml) L-Phenylalanin (1 γ/ml), so setzt nach einer Stunde Wachstum ein. Das Antibiotikum wirkt wie ein typischer Aminosäureantimetabolit bakteriostatisch und nicht bakterizid.

6. Test auf Kreuzresistenz zwischen L-2,5-Dihydrophenylalanin und DL-p-Fluorphenylalanin

Die strukturelle Ähnlichkeit des Antibiotikums mit seinem spezifischen Antagonisten L-Phenylalanin und die Aufhebung der Hemmwirkung durch L-Phenylalanin und L-Tyrosin sprachen dafür, daß L-2,5-H_2-Phe in der Zelle als Antimetabolit zu Phenylalanin wirkt. Nähere Anhaltspunkte in dieser Richtung gab ein anderes synthetisches Strukturanaloges zu Phenylalanin, das p-Fluorphenylalanin, das in seiner Wirkungsweise gut untersucht ist (MUNIER und COHEN, 1956; PREVIC und BINKLEY, 1964a, b; HARDY und BINKLEY, 1967; BROSTROM und BINKLEY, 1969a, b; CARPENTER und BINKLEY, 1968). Dieses wirkt auf E. coli K 12 ebenfalls wachstumshemmend und wird in seiner Wirkung durch Phenylalanin und Tyrosin aufgehoben (SHIVE und SKINNER, 1963). Sollten Mutanten, die resistent gegen p-Fluorphenylalanin sind, auch resistent gegen L-2,5-H_2-Phe sein,

so würde dies, sofern Eindringungsresistenz auszuschließen ist (MOYED, 1964), für eine ähnliche oder gleiche Wirkungsweise sprechen.

Es wurden daher mehrere Mutanten von E. coli K 12 selektioniert, die resistent waren gegen 10^{-3} molar DL-p-Fluorphenylalanin.

Drei der resistenten Mutanten wurden näher auf eine Wachstumshemmung durch das Antibiotikum untersucht. Bei zwei dieser Mutanten konnte durch L-2,5-H_2-Phe sowohl im Platten-

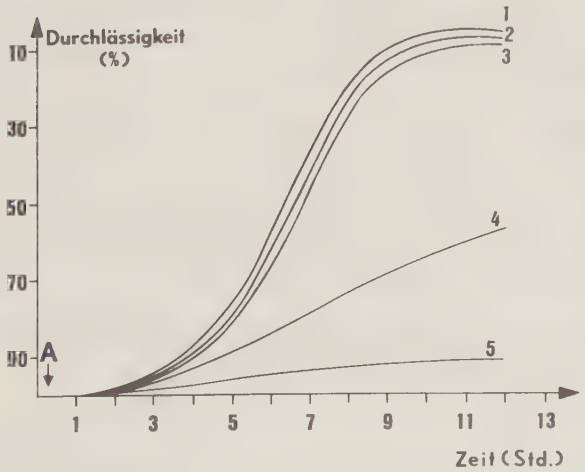

Abb. 9: Empfindlichkeit des DL-p-F-Phenylalanin-resistenten Stammes Nr. 1 von E. coli K 12 gegen L-2,5-Dihydrophenylalanin und DL-p-Fluorphenylalanin
1: Kontrolle Stamm Nr. 1; 2: Stamm Nr. 1 mit 15 γ L-2,5-Dihydrophenylalanin/ml; 3: Stamm Nr. 1 mit 15 γ DL-p-Fluorphenylalanin; 4: E. coli K 12 Wildstamm mit 15 γ DL-p-Fluorphenylalanin; 5: E. coli K 12 mit 15 γ L-2,5-Dihydrophenylalanin. Die Antimetaboliten wurden bei A zugesetzt.

diffusionstest mit 5 mg/ml als auch im Biophotometer-Versuch mit 15 γ/ml keine Wachstumshemmung mehr festgestellt werden. Bei der dritten Mutante war die Hemmwirkung im Vergleich zur Kontrolle nur schwächer.

Abbildung 9 zeigt die Wirkung beider Antimetaboliten auf das Wachstum des p-Fluorphenylalanin-resistenten Stammes Nr. 1.

Die Kreuzresistenz mit p-Fluorphenylalanin war neben der Aufhebung der Wachstumshemmung durch Phenylalanin ein weiterer Hinweis für die Wirkungsweise des Antibiotikums. Die Primärwirkung von p-Fluorphenylalanin auf E. coli beruht darauf, daß es auf einige Enzyme der Biosynthese aromatischer Aminosäuren als falscher Feedback-Hemmer wirkt. Für das erste Enzym der Aromatenbiosynthese, die DAHP-Synthetase (Abb. 15), wurde außerdem eine Repression durch p-Fluorphenylalanin nachgewiesen (PREVIC und BINKLEY, 1964a).

Im folgenden wurde nun untersucht, ob das Antibiotikum ebenfalls in die Regulation der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren eingreift. Da Tryptophan und die Zwischenprodukte seiner Biosynthese die Wachstumshemmung durch L-2,5-H_2-Phe nicht antagonisieren, wurde ein Einfluß auf die Enzyme der Tryptophan-Biosynthese nicht untersucht.

7. Einfluß von L-2,5-Dihydrophenylalanin auf die Aktivität und die Synthese der DAHP-Synthetase

Die erste spezifische Reaktion in der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren ist die Kondensation von Erythrose-4-phosphat (E-4-P) und Phosphoenolpyruvat (PEP) zu 3-Desoxy-D-arabino-heptulonsäure-7-phosphat (DAHP). Wie aus dem Regulationsschema Abbildung 15 hervorgeht, wird diese Reaktion bei E. coli K 12 von drei DAHP-Synthetase-Isoenzymen katalysiert, deren Aktivität und Synthese durch jeweils eine der drei aromatischen Aminosäuren reguliert wird (DOY und BROWN, 1965; WALLACE und PITTARD, 1967a, b; WALLACE und PITTARD, 1969a, b).

a) Isolierung des Phe-sensitiven Isoenzyms der DAHP-Synthetase

Der Einfluß von L-2,5-H_2-Phe auf die Gesamtaktivität der DAHP-Synthetase wurde im Rohextrakt getestet. Dagegen mußten für die Untersuchung des Phe-sensitiven Isoenzyms (Isoenzym 1a), das bei E. coli K 12 90 % der Gesamtaktivität der DAHP-Synthetase ausmacht (STAUB und DENES, 1969a), die drei Isoenzyme getrennt werden. Dies gelang nach DOY und BROWN (1965) durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung.

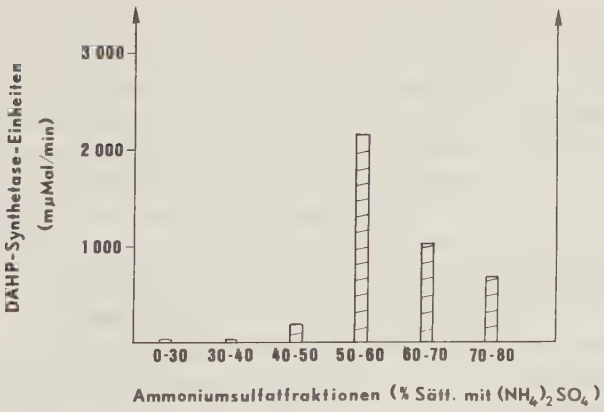

Abb. 10: DAHP-Synthetase-Aktivität in den einzelnen Ammoniumsulfatfraktionen (ausgehend vom Protaminsulfatüberstand mit 540 mg Protein)

Aus Abbildung 10 geht hervor, daß in der Fraktion 0,5 - 0,6 gesättigt mit Ammoniumsulfat das Maximum der DAHP-Synthetase-Aktivität ist. Zugleich ist dies, wie aus Tabelle 5 zu ersehen ist, die Fraktion mit der größten spezifischen Aktivität.

Tab. 5: Spezifische Aktivität der DAHP-Synthetase in den einzelnen Ammoniumsulfatfraktionen

Fraktion Ammonium-sulfatsättigung	Gesamt-protein (mg)	Gesamt-aktivität µMol DAHP/ min	spez. Aktivität µMol DAHP/ min/mgProt.
0,4 - 0,5	180	190	1
0,5 - 0,6	145	2300	16
0,6 - 0,7	90	1040	11
0,7 - 0,8	100	700	7

Da die Aktivität der Fraktion 0,5 - 0,6 gesättigt mit Ammoniumsulfat durch 10^{-5} m Phenylalanin noch zu rund 50 % gehemmt wird, durch Tyrosin in gleicher Konzentration dagegen keine Hemmung mehr festzustellen war, liegt in dieser Fraktion nur das Phe-sensitive Isoenzym vor (DOY und BROWN,1965a). Sowohl das Tyr-sensitive als auch das Try-sensitive Isoenzym konnten nach der Ammoniumsulfatfällung nicht mehr nachgewiesen werden (STAUB und DENES, 1969a).

b) Feedback-Hemmung

Unter den angegebenen Standardbedingungen für die Aktivitätsbestimmung der DAHP-Synthetase wurde geprüft, ob L-2,5-H_2-Phe einen Einfluß auf die Aktivität dieses Enzyms hat. Der Test wurde ausgeführt

α) mit dialysiertem Rohextrakt von E. coli K 12, in dem die Gesamtaktivität der DAHP-Synthetase vorliegt,

β) mit der Fraktion 0,5 - 0,6 gesättigt mit Ammoniumsulfat, die das Phe-sensitive Isoenzym enthält und

γ) mit dialysiertem Rohextrakt der Mutante AB 3259 von E. coli K 12, die nur das Phe-sensitive Isoenzym hat.

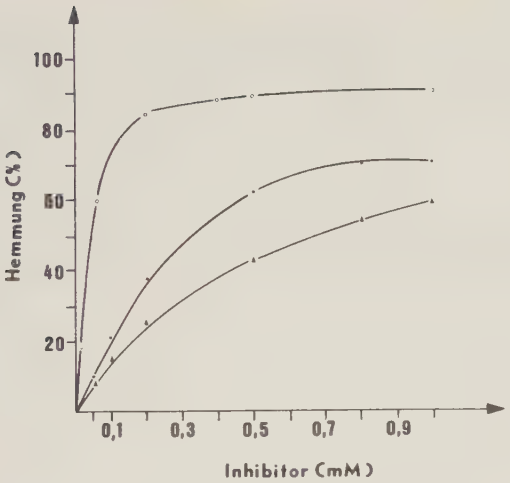

Abb. 11: Hemmung der DAHP-Synthetase-Aktivität (Phe-sensitives Isoenzym) durch ○——○ L-Phenylalanin; •——• L-2,5-Dihydrophenylalanin; ▲——▲ DL-p-Fluorphenylalanin.
Enzym: Fraktion 0,5 - 0,6 gesättigt $(NH_4)_2SO_4$.

Wie Abbildung 11 zeigt, wurde eine Abhängigkeit der Hemmung der Aktivität des Phe-sensitiven Isoenzyms von der Konzentration an L-2,5-H_2-Phe gefunden. Zum Vergleich wurde noch die Hemmung durch L-Phenylalanin und DL-p-Fluorphenylalanin im gleichen Konzentrationsbereich bestimmt. Die Hemmwirkung von Phenylalanin steigt im Gegensatz zu der von L-2,5-H_2-Phe und p-Fluorphenylalanin innerhalb eines relativ kleinen Konzentrationsbereiches - zwischen 0,01 - 0,2 mM - sehr steil an. Durch höhere Konzentrationen wird die Hemmung nicht mehr wesentlich verstärkt und erreicht bei $5 \cdot 10^{-4}$ M Phenylala-

nin einen Sättigungswert. Für L-2,5-H_2-Phe und p-Fluorphenylalanin verlaufen die entsprechenden Kurven dagegen wesentlich flacher.

Die Gesamtaktivität der DAHP-Synthetase im dialysierten Rohextrakt von E. coli K 12 wurde durch 10^{-3} und $5 \cdot 10^{-4}$ M L-2,5-H_2-Phe im gleichen Ausmaß wie das Phe-sensitive Isoenzym gehemmt. Auch die Hemmung des Phe-sensitiven Isoenzyms aus der Mutante AB 3259 (WALLACE und PITTARD, 1969b), getestet im dialysierten Rohextrakt, stimmte mit der in Abbildung 11 ermittelten überein. Die Abweichungen, die aus verschiedenen Versuchsansätzen resultieren, betrugen maximal 6 %.

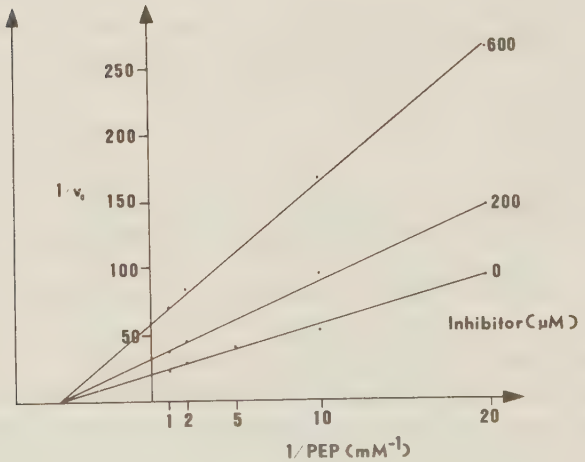

Abb. 12: Lineweaver-Burk-Diagramm der Substratsättigungskurven bei verschiedenen L-2,5-Dihydrophenylalanin-Konzentrationen
Ansatz: Enzym der Acetonfraktion; 0,75 µMol E-4-P; 50 µl KH_2PO_4-NaOH-Puffer pH 7,2; v_o: µMol DAHP/Ansatz/10 min.

Eine Zuordnung der Hemmung durch L-2,5-H_2-Phe zu einem der möglichen Hemmtypen und die Bestimmung der Inhibitorkonstanten K_i des Phe-sensitiven Isoenzyms für das Antibiotikum als Maß für seine Affinität zum Enzym wurde mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Diagramms ermittelt (WEBB, 1963; DIXON und WEBB, 1964; REINER, 1969). In Abbildung 12 ist die Hemmung dieses Isoenzyms in Abhängigkeit von der Substratkonzentration für zwei verschiedene L-2,5-H_2-Phe-Konzentrationen wiedergegeben.

Aus dem Diagramm geht hervor, daß L-2,5-H_2-Phe das Enzym in bezug auf Phosphoenolpyruvat nichtkompetitiv hemmt. Das Substrat hat keinen Einfluß auf die Bindung des Inhibitors und umgekehrt, aber die Maximalgeschwindigkeit der Enzymreaktion nimmt mit steigender Inhibitorkonzentration ab. Die Inhibitorkonstante K_i für L-2,5-H_2-Phe beträgt $1{,}8 \cdot 10^{-4}$ M; STAUB und DENES (1969b) bestimmten für Phenylalanin eine Inhibitorkonstante $K_i = 3{,}8 \cdot 10^{-5}$ M. Aus diesen beiden Werten geht hervor, daß die Affinität des Phe-sensitiven Isoenzyms zu Phenylalanin etwa 20 mal größer als zu L-2,5-H_2-Phe ist und Phenylalanin deshalb die Aktivität stärker hemmt.

c) Repression

Wie das Regulationsschema Abbildung 15 zeigt, unterliegen die drei Isoenzyme der DAHP-Synthetase nicht nur einer Feedback-Hemmung durch je eine der drei aromatischen Aminosäuren, sondern auch einer Repression. Die Schwierigkeit, eine solche Hemmung der Synthese der DAHP-Synthetase durch L-2,5-H_2-Phe nachzuweisen, lag einerseits in seiner bakteriostatischen Wirkung und andererseits darin, daß es in der exponentiellen Phase nicht mehr wirksam ist. Bei Zugabe des Antibiotikums in Konzentrationen, die unter der minimalen Hemmkonzentration lagen (10^{-5} M) und nur eine verlängerte Generationszeit zur Folge hatten, konnte keine Repression festgestellt werden. Dies war zu erwarten, da auch Phenylalanin, von dem anzunehmen ist, daß es besser reprimiert, in dieser Konzentration die Bildung der DAHP-Synthetase nur minimal hemmt.

Die Repressionsversuche wurden daher so ausgeführt, daß zu Beginn der lag-Phase gleichzeitig mit dem Antibiotikum Phenylalanin in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-5}$ M zugegeben wurde. Diese Menge reicht zum Wachstum der Kultur aus, ist aber so gering, daß die dadurch bewirkte Repression durch einen zweiten Repressor noch um maximal 45 % verstärkt werden kann (BROWN und DOY, 1966).

Da die Repression der DAHP-Synthetase unabhängig von der Wachstumsphase der Kultur ist (DOY und BROWN, 1965), konnten die Zellen zur Bestimmung der spezifischen Aktivität in der Mitte der exponentiellen Phase geerntet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Wie aus den Werten hervorgeht, wird die durch Phenylalanin hervorgerufene Repression durch die Zugabe des Antibiotikums maximal um 32 % verstärkt. Im Vergleich zu Phenylalanin ist L-2,5-H_2-Phe also ein wesentlich schwächerer Repressor.

Tabelle 6: Repression der DAHP-Synthetase durch L-Phenylalanin und L-2,5-Dihydrophenylalanin
Es wurde die spezifische Gesamtaktivität im dialysierten Rohextrakt gemessen.

Zugesetzte Substanz (Mol/l)	Gesamt-Repression (%)	Repression durch L-2,5-H_2-Phe (%)
$2,5 \cdot 10^{-5}$ Phe	26	
$5,0 \cdot 10^{-5}$ Phe	50	
10^{-4} Phe	68	
$5,0 \cdot 10^{-5}$ L-2,5-H_2-Phe + $2,5 \cdot 10^{-5}$ Phe	54	28
$8,0 \cdot 10^{-5}$ L-2,5-H_2-Phe + $2,5 \cdot 10^{-5}$ Phe	57	31
10^{-4} L-2,5-H_2-Phe + $2,5 \cdot 10^{-5}$ Phe	58	32

8. Einfluß von L-2,5-Dihydrophenylalanin auf die Aktivität der Chorismatmutase

Phenylalanin wirkt bei E. coli nicht nur regulierend auf das erste Enzym im gemeinsamen Grundzweig der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren, sondern auch auf die ersten Enzyme seiner eigenen Biosynthesekette. So wird eines der beiden Isoenzyme der Chorismatmutase, die die Umwandlung der Chorisminsäure in Prephensäure katalysieren, durch Phenylalanin reprimiert (COTTON und GIBSON, 1965; YOUNG et al., 1969). Dagegen beeinflußt es nicht die Aktivität dieser Isoenzyme.

Wie zu erwarten war, hemmt auch L-2,5-H_2-Phe unter den angegebenen Testbedingungen in einem Konzentrationsbereich von $5 \cdot 10^{-4}$ bis $2 \cdot 10^{-3}$ M die Chorismatmutase-Aktivität nicht. Es wurden hierbei die beiden Isoenzyme nicht getrennt untersucht, sondern es wurde die Wirkung auf die Gesamtaktivität im Rohextrakt festgestellt.

Vergleichend wurde auch der Einfluß des Antibiotikums auf gereinigte Chorismatmutase von Claviceps paspali untersucht, da deren Aktivität im Gegensatz zu der von E. coli durch Phenylalanin und Tyrosin hemmbar ist (LINGENS, GOEBEL et al., 1967; SPRÖSSLER und LINGENS, 1970). Wie aus Tabelle 7 hervor-

Tabelle 7: Hemmung der Chorismatmutase-Aktivität bei Claviceps paspali durch L-2,5-Dihydrophenylalanin

L-2,5-H_2-Phe (Mol/l)	Hemmung der Chorismatmutase-Aktivität (%)
$5{,}0 \cdot 10^{-4}$	38
$8{,}0 \cdot 10^{-4}$	56
$1{,}6 \cdot 10^{-3}$	68

geht, hemmt auch L-2,5-H_2-Phe die Gesamtaktivität dieses Enzyms. Für einige Konzentrationen ist hierbei die Hemmung in Prozent angegeben.

9. Einfluß von L-2,5-Dihydrophenylalanin auf die Aktivität der Prephenatdehydratase

Die beiden Isoenzyme der Chorismatmutase sind bei E. coli jeweils mit dem darauffolgenden Enzym, der Prephenatdehydrogenase und der Prephenatdehydratase, zu einem Komplex vereinigt (COTTON und GIBSON, 1965). Aus dem Regulationsschema Abbildung 15 geht hervor, daß die Prephenatdehydrogenase durch Tyrosin in ihrer Aktivität gehemmt und reprimiert wird. Die Prephenatdehydratase wird entsprechend durch Phenylalanin reguliert. Da in Vorversuchen auch eine Hemmung der Prephenatdehydratase im Rohextrakt durch L-2,5-H_2-Phe gefunden wurde, wurde dieses Enzym durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung angereichert und gereinigt.

a) Anreicherung der Prephenatdehydratase

Die Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung bei der Präparation der DAHP-Synthetase wurden auch auf ihre Prephenatdehydratase-Aktivität hin untersucht. Wie aus dem Diagramm Abbildung 13 hervorgeht, zeigt die Fraktion 0,4 - 0,5 gesättigt mit $(NH_4)_2SO_4$ ein Maximum an Enzymaktivität. Diese Fraktion hat zugleich auch die größte spezifische Aktivität (15 µMol Phenylbrenztraubensäure/min/mg Protein).

b) Feedback-Hemmung

Mit der dialysierten Ammoniumsulfatfraktion 0,4 - 0,5 gesättigt mit $(NH_4)_2SO_4$ wurde der Einfluß des Antibiotikums auf die Aktivität der Prephenatdehydratase untersucht. Zum Vergleich wurde für den gleichen Konzentrationsbereich auch die Hemmung durch Phenylalanin ermittelt. Der Test ergab,

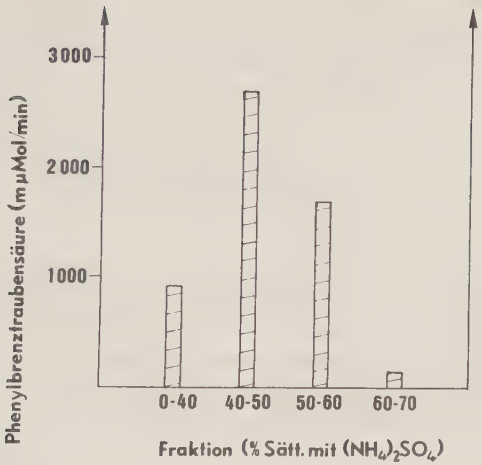

Abb. 13: Prephenatdehydratase-Aktivität in den einzelnen Ammoniumsulfatfraktionen (ausgehend vom Protaminsulfatüberstand mit 540 mg Protein)

daß L-2,5-H_2-Phe die Aktivität der Prephenatdehydratase hemmt.

In Abbildung 14 ist die Abhängigkeit der Hemmung von der Antibiotikum-Konzentration wiedergegeben. Bei einer Konzentration von 10^{-3} M hemmt L-2,5-H_2-Phe die Aktivität zu 66 %, Phenylalanin zu 93 %. Durch höhere Inhibitor-Konzentrationen ($2 \cdot 10^{-3}$) konnte die Hemmung durch das Antibiotikum noch bis auf 93 % erhöht werden.

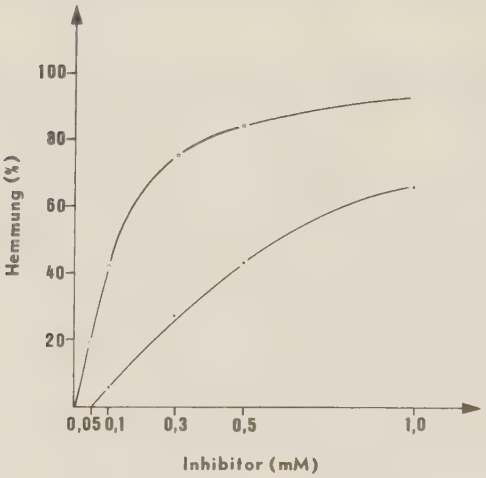

Abb. 14: Hemmung der Prephenatdehydratase-Aktivität durch
o——o L-Phenylalanin und •——•L-2,5-Dihydrophenyl-
alanin.
Enzym: Ammoniumsulfatfraktion 0,4 - 0,5 gesättigt
$(NH_4)_2SO_4$

IV. Diskussion

Das von Streptomyces parvulus (Stamm Tü 64) und Streptomyces arenae (Stamm Tü 109) produzierte Antibiotikum L-2,5-Dihydrophenylalanin greift, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, bei E. coli K 12 als Antimetabolit zu Phenylalanin in die Regulation der Biosynthese aromatischer Aminosäuren ein. Um die Wirkung dieses Antibiotikums besser verstehen zu können, sei zunächst näher auf die Regulation der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren eingegangen.

Wie aus dem Regulationsschema Abbildung 15 hervorgeht, zweigen in dieser Biosynthesekette von einem gemeinsamen Grundzweig die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, sowie die Vitamine mit aromatischem Grundgerüst ab. Die Aminosäuren regulieren ihre Syntheserate dem jeweiligen Bedarf entsprechend durch Feedback-Hemmung und Repression einiger Enzyme ihrer Biosynthesekette und des ersten Enzyms im Grundzweig, der DAHP-Synthetase (COHEN, 1965; STADTMAN, 1966; LINGENS, 1968). Im ersten Schritt werden Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat zu DAHP kondensiert. Diese Reaktion wird von den drei Isoenzymen der DAHP-Synthetase katalysiert, die hauptsächlich durch je eine der drei aromatischen Aminosäuren allosterisch gehemmt und reprimiert werden (FRADEJAS et al., 1961; SMITH et al., 1962; BROWN und DOY, 1963; DOY, 1967; WALLACE und PITTARD, 1967a, b; DOY, 1968; PITTARD et al., 1969). Das Ausmaß der Feedback-Hemmung konnte bei Mutanten, die nur ein einziges intaktes Isoenzym besitzen, eindeutig ermittelt werden (WALLACE und PITTARD, 1967; WALLACE und PITTARD, 1969a, b). Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Weiterhin wirken die Aminosäuren, die die Aktivität eines jeden Isoenzyms charakteristisch hemmen, auch reprimierend auf seine Synthese (Tab. 9). Zusätzlich findet man noch "cross-repression"; so wird das Phe-sensitive Isoenzym noch

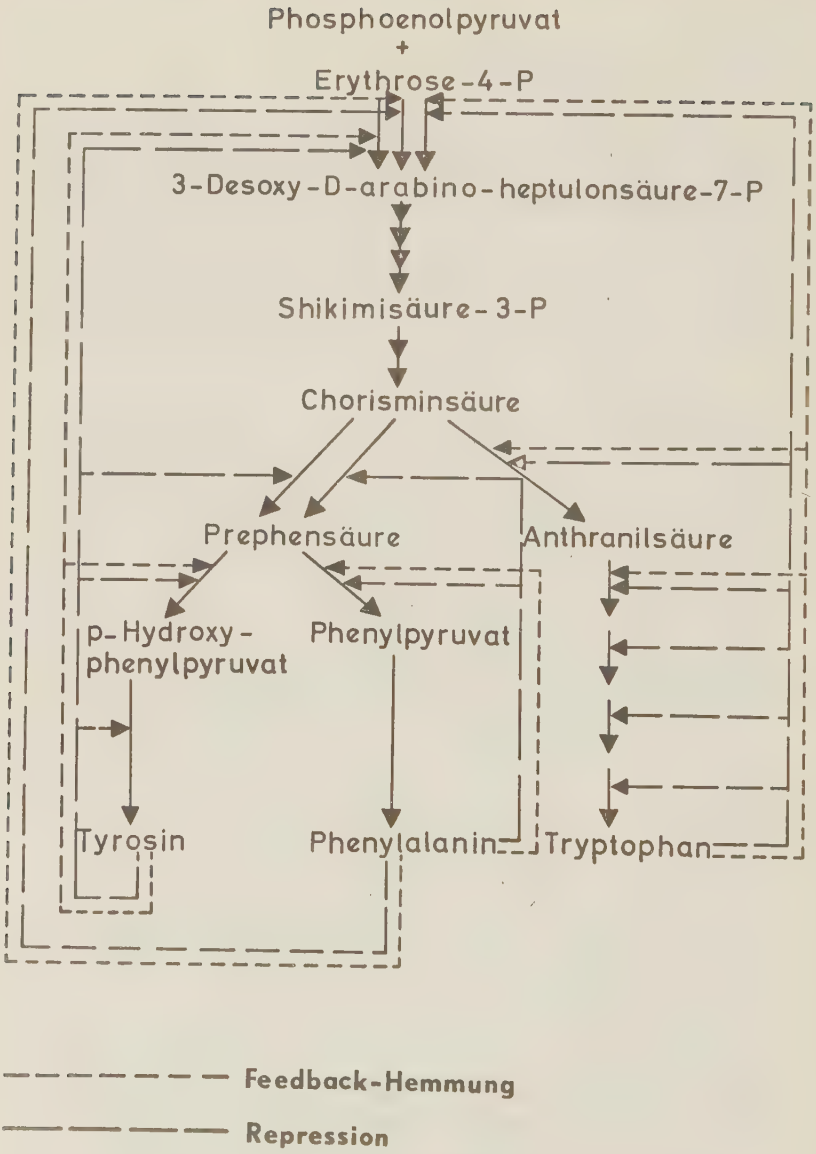

Abb. 15: Regulationsschema der Biosynthese aromatischer Aminosäuren in Escherichia coli K 12

Tab. 8: % Hemmung der DAHP-Synthetase-Isoenzyme von E. coli K 12 durch die aromatischen Aminosäuren (GIBSON und PITTARD, 1968)

DAHP-Synthetase Isoenzyme	Tyrosin		Phenylalanin		Tryptophan	
	10^{-3} M	10^{-5} M	10^{-3} M	10^{-5} M	10^{-3} M	10^{-5} M
(Tyr-sensitiv)	95	50	5	0	0	0
(Phe-sensitiv)	40	0	95	60	0	0
(Trp-sensitiv)	0	0	0	0	60	20

Tab. 9: % Repression der Isoenzyme der DAHP-Synthetase bei E. coli K 12 durch die aromatischen Aminosäuren (BROWN und DOY, 1966; BROWN, 1968)

Zusatz (10^{-4} m)	D A H P - S y n t h e t a s e		
	Phe-sensitiv	Tyr-sensitiv	Trp-sensitiv
Phe	60	0	0
Tyr (10^{-3} M) (bei E. coli W)	10	100	0
Trp	30	25	50
Phe + Tyr	8	100	0
Phe + Tyr + Trp	40	100	50

durch Tryptophan, das Tyr-sensitive Isoenzym in hohen Konzentrationen (10^{-3} M) durch Phenylalanin und Tryptophan reprimiert (BROWN und DOY, 1966).

Außer der DAHP-Synthetase unterliegen die übrigen Enzyme des Grundzweiges, die die Bildung der Chorismsäure aus DAHP

katalysieren, keiner Regulation, die für den Chorisminsäurespiegel in der Zelle von Bedeutung ist (FEWSTER, 1962; SRINIVASON et al., 1963; BROWN, 1968).

Wie aus dem Regulationsschema Abbildung 15 hervorgeht, zweigen von der Chorisminsäure die Biosyntheseketten der drei aromatischen Aminosäuren ab (GIBSON und GIBSON, 1962 und 1964; EDWARDS und JACKMANN, 1965). Während Tryptophan über die Anthranilsäure gebildet wird (ITO und CRAWFORD, 1965; BAKER und CRAWFORD, 1966), haben Phenylalanin und Tyrosin den ersten Schritt ihrer Biosynthese, die Umwandlung von Chorisminsäure in Prephensäure, gemeinsam. Diese Reaktion wird von zwei Isoenzymen katalysiert, von der Chorismatmutase T und P (COTTON und GIBSON, 1965). Beide Enzyme tragen je noch eine weitere Aktivität, die Prephenatdehydrogenase- und die Prephenatdehydratase-Aktivität, die den jeweils darauffolgenden Schritt katalysieren (SCHWINCK und ADAMS, 1959; COTTON und GIBSON, 1965). Tyrosin reprimiert die Chorismatmutase T und die Prephenatdehydrogenase, jedoch hemmt es nur die Aktivität der Prephenatdehydrogenase. Im Phenylalanin-Biosynthesezweig wird die Chorismatmutase P und die Prephenatdehydratase durch Phenylalanin reprimiert. Außerdem wirkt Phenylalanin als Feedback-Hemmer auf die Prephenatdehydratase.

Der letzte Reaktionsschritt in der Tyrosin-Biosynthese, die Umsetzung von 4-Hydroxyphenylpyruvat in Tyrosin, wird von der Transaminase A katalysiert (SILBERT et al., 1963; SCHEPARTZ, 1969). Dieses Enzym besitzt im geringen Umfang auch die Fähigkeit, Phenylbrenztraubensäure in Phenylalanin umzuwandeln. Die Transaminase A wird durch Tyrosin reprimiert, dagegen nicht durch Phenylalanin (SILBERT et al., 1963).

Aufgrund seiner nur geringfügig von Phenylalanin abweichenden Struktur wirkt L-2,5-Dihydrophenylalanin als falscher Feedback-Hemmer auf diejenigen Enzyme der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren, die durch Phenylalanin allosterisch gehemmt werden. Bei einer Konzentration von 10^{-3} M reduziert

es in vitro die Gesamtaktivität der DAHP-Synthetase im Wildstamm von E. coli K 12 zu 72 %, die der Prephenatdehydratase zu 67 %. Phenylalanin hemmt bei gleicher Konzentration die Aktivität der DAHP-Synthetase zu 92 %, die der Prephenatdehydratase zu 95 %. Das Phe-sensitive Isoenzym der DAHP-Synthetase, das 90 % der Gesamtaktivität der DAHP-Synthetase ausmacht, wird im gleichen Ausmaß gehemmt. Daraus könnte man den Schluß ziehen, daß das Tyr-sensitive Isoenzym durch das Antibiotikum nicht gehemmt wird. Da der Anteil dieses Isoenzyms an der Gesamtaktivität aber nur 7 - 8 % ausmacht, kann dieser Prozentsatz innerhalb der Fehlergrenze bei der enzymatischen Bestimmung liegen. Aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm Abbildung 12 geht hervor, daß L-2,5-Dihydrophenylalanin das Phe-sensitive Isoenzym nichtkompetitiv hemmt. Die Inhibitorkonstante K_i ist $1{,}8 \cdot 10^{-4}$ M, für Phenylalanin entsprechend der größeren Affinität zum allosterischen Zentrum $3{,}8 \cdot 10^{-5}$ M (STAUB und DENES, 1969b). Die Repression der DAHP-Synthetase durch das Antibiotikum ist unter den angegebenen Bedingungen 50 % geringer als durch Phenylalanin. Die Zugabe von 10^{-4} M L-2,5-Dihydrophenylalanin bewirkt eine 30 %ige Repression der Enzymsynthese.

Die Aktivität der Chorismatmutase bei E. coli K 12 wird durch das Antibiotikum nicht gehemmt. Bei Claviceps paspali wird dieses Enzym durch $1{,}6 \cdot 10^{-3}$ M L-2,5-Dihydrophenylalanin zu 68 % gehemmt. Im Gegensatz zu E. coli unterliegt die Chorismatmutase hier auch einer Feedback-Hemmung durch Phenylalanin (LINGENS et al., 1967; SPRÖSSLER und LINGENS, 1970).

Die bakteriostatische Wirkung des Antibiotikums ist aus folgenden Gründen primär auf eine falsche Feedback-Hemmung der Phe-sensitiven Enzyme zurückzuführen:

1. Das Phe-sensitive Isoenzym der DAHP-Synthetase, das durch L-2,5-Dihydrophenylalanin zu 72 % gehemmt wird, macht 90 % der Gesamtaktivität der DAHP-Synthetase aus (STAUB und DENES, 1969a).

2. Für die Regulation der Phe-sensitiven DAHP-Synthetase spielt die Feedback-Hemmung eine wesentlich größere Rolle als die Repression. Dies geht unter anderem daraus hervor, daß Stämme, die nur das Phe-sensitive Isoenzym besitzen, bei Zusatz von Phenylalanin und Tryptophan zum Kulturmedium nicht wachsen. Dagegen wird das Wachstum bei Mutanten dieses Stammes, bei denen das Phe-sensitive Isoenzym feedback-resistent ist, nicht gehemmt, obwohl das Enzym im gleichen Ausmaß wie beim Wildstamm reprimierbar ist (GIBSON und PITTARD, 1968).

3. Die minimale Hemmkonzentration in vivo und die Konzentration, die in vitro für eine maximale Hemmung erforderlich ist, stimmen, bezogen auf die Proteinmenge miteinander überein. Für den Aktivitätstest mit Rohenzymextrakt lag durchschnittlich ein Proteingehalt von 0,11 mg/ml vor. Eine optimale Hemmung wurde durch 10^{-3} M Antibiotikum gefunden. In vivo lag die Hemmkonzentration bei $5 \cdot 10^{-5}$ M, was annähernd genau dem geringeren Proteingehalt (0,004 mg/ml in der lag-Phase) entspricht.

4. Bei Zugabe von L-2,5-Dihydrophenylalanin zu einer exponentiell wachsenden Kultur wird das Wachstum nicht beeinflußt. Dies ist auf den sehr hohen intrazellulären Pool an aromatischen Aminosäuren zurückzuführen. In der exponentiellen Phase liegt Phenylalanin $5{,}3 \cdot 10^{-4}$ M, Tyrosin $4 \cdot 10^{-4}$ M und Tryptophan $2{,}3 \cdot 10^{-4}$ M vor (DOY und BROWN, 1965).

5. Die bakteriostatische Wirkung ist nicht auf einen Vitaminmangel zurückzuführen, da selbst bei Zugabe der drei aromatischen Aminosäuren noch genügend Chorismінsäure für die Synthese der Vitamine gebildet wird (WALLACE und PITTARD, 1969b).

Neben Phenylalanin hebt auch Tyrosin die Hemmwirkung von L-2,5-Dihydrophenylalanin in vivo auf. Der Inhibitionsindex ist 1. Da bei E. coli Tyrosin nicht in Phenylalanin umgewandelt werden kann (MITOMA und LEEPER, 1954; MILLER und SIMMONDS, 1957; CHAPMAN und DAGLEY, 1960; CHANDRA und VINING,

1968), hat die aufhebende Wirkung eine andere Ursache. Tyrosin stimuliert die Synthese des Phe-sensitiven Isoenzyms der DAHP-Synthetase (BROWN und DOY, 1966). Bei einer E. coli-Kultur, die in Gegenwart von 10^{-3} M Tyrosin wächst, ist die Gesamtaktivität der DAHP-Synthetase im Vergleich zur Kontrolle in der Mitte der exponentiellen Phase rund 25 % höher. Da mit steigender Substratkonzentration entweder die Hemmung der Aktivität vermindert wird oder die Maximalgeschwindigkeit der gehemmten Enzymreaktion zunimmt, könnte die Hemmung durch L-2,5-Dihydrophenylalanin auf die Prephenatdehydratase durch eine Erhöhung des Chorisminsäure- und somit des Prephensäurespiegels so stark reduziert werden, daß genügend Phenylalanin für das Zellwachstum gebildet wird.

Im Kreuztest konnte durch Chorisminsäure allerdings keine Aufhebung der Wachstumshemmung gezeigt werden. Die Ursache dafür ist, daß Chorisminsäure von der Zelle nicht aufgenommen wird und schon bei 37° C, der Inkubationstemperatur, wie die Prephensäure instabil ist (GIBSON und GIBSON, 1964). Nicht zu erklären ist dagegen der Befund, daß Phenylbrenztraubensäure die Wachstumshemmung nicht aufhebt. Es könnte dies ebenfalls eine Frage der Permeabilität sein.

Der Einbau von L-2,5-Dihydrophenylalanin ins Protein wurde nicht untersucht, aber einige Befunde sprechen dafür. So ist von einigen Aminosäuren bekannt, daß sie nur in aktivierter Form ihre eigenen Biosynthese-Enzyme reprimieren. Dies konnte für Isoleucin und Valin (EIDLIC und NEIDHARDT, 1965), für Histidin (ROTH und AMES, 1966) und für Threonin (NASS et al., 1969) gezeigt werden. Auch das Phe-sensitive Isoenzym der DAHP-Synthetase soll nach DUDA et al. (1968) nicht durch die freie Aminosäure Phenylalanin, sondern durch den Phenylalanyl-t-RNS-Komplex reprimiert werden. L-2,5-Dihydrophenylalanin wirkt auf dieses Enzym ebenfalls als Corepressor, deshalb kann angenommen werden, daß dieser Phenylalanin-Antimetabolit an die $t\text{-RNS}^{Phe}$ gebunden wird. Da das Anhängen einer Aminosäure an die zugehörige t-RNS durch die Aminoacyl-t-RNS-

Synthetase den eigentlich spezifischen Schritt für die Proteinsynthese darstellt, ist es sehr wahrscheinlich, daß damit auch ein Einbau von L-2,5-Dihydrophenylalanin ins Protein erfolgt. Die Struktur der Aminosäure spielt für die weiteren Schritte der Proteinsynthese an den Ribosomen nur noch eine untergeordnete Rolle. So kann zum Beispiel die Aminosäure Cystein, wenn sie einmal an die t-RNS angehängt ist, chemisch in Alanin umgewandelt werden, und dieses wird dann an der für das Cystein vorgesehenen Stelle ins Protein eingebaut (JOCKUSCH und WITTMANN, 1966).

Ein weiterer Hinweis für den Einbau des Antibiotikums ins Protein ist seine letale Wirkung auf Ratten. Da diese selber kein Phenylalanin bilden, könnte der letale Effekt darauf beruhen, daß L-2,5-Dihydrophenylalanin an Stelle von Phenylalanin in Proteine eingebaut wird, wodurch diese ihre Funktionsfähigkeit verlieren (SNOW et al., 1968). So ist von einem anderen Aminosäureanalogen, dem Methylhistidin, bekannt, daß es an Stelle von Histidin ins Protein eingebaut wird und die Bildung einer inaktiven alkalischen Phosphatase zur Folge hat (SCHLESINGER und SCHLESINGER, 1969). Außerdem konnte für die gut untersuchten, synthetischen Phenylalanin-Antimetaboliten p-Fluorphenylalanin und ß-Thienylalanin bei E. coli ein Einbau ins Protein nachgewiesen werden (MUNIER und COHEN, 1957; JANACEK und RICKENBERG, 1956; EZEKIEL, 1965).

Der Grund dafür, daß bei Zugabe von L-2,5-Dihydrophenylalanin zu einer Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase das Wachstum durch einen möglichen Einbau des Antibiotikums ins Protein nicht beeinflußt wird, dürfte auch hier, wie bei der Kompensation der DAHP-Synthetase-Hemmung, der hohe intrazelluläre Phenylalanin-Spiegel sein. Hierbei ist zu vermuten, daß die Phe-t-RNS-Synthetase eine höhere Affinität zu Phenylalanin als zum Antibiotikum besitzt und somit bei einer hohen Phenylalanin-Konzentration in der Zelle dieses bevorzugt ins Protein eingebaut wird. Bei einem sehr niedrigen intra-

zellulären Phenylalanin-Spiegel, wie er beispielsweise in der lag-Phase vorliegt, ist dagegen ein Einbau des Antibiotikums verbunden mit einer Wachstumshemmung denkbar.

Durch einen Vergleich der unterschiedlichen Hemmwirkung einer Anzahl von Phenylalanin-analogen auf das Phe-sensitive Isoenzym der DAHP-Synthetase wurde festgestellt, inwieweit die Konstitution des Phenylalaninmoleküls verändert werden kann, ohne daß es seine Hemmwirkung verliert (SMITH et al., 1964). Entscheidend für die Affinität zum allosterischen Zentrum des Isoenzyms scheint die planare Konformation des Moleküls, wie sie auch Phenylalanin hat, zu sein (SHOULDERS et al., 1968). Die Konstitution kann durch Einführen von Substituenten, einer anderen Seitenkette als Alanin oder durch Ersatz des Benzolringes durch einen heterocyclischen Ring insoweit verändert werden, als die planare Konformation erhalten bleibt. Eine wesentliche Voraussetzung hierfür ist die Anwesenheit von mindestens einer Doppelbindung im Ring. Für L-2,5-Dihydrophenylalanin ist eine planare Konformation nachgewiesen (SHOULDERS et al., 1968). Es ist auf Leuconostoc dextranicum 50 bis 100 mal wirksamer als die entsprechende Verbindung mit nur einer Doppelbindung im Ring, das Cyclohexen-1-alanin (PAL et al., 1956). Cyclopentan-1-alanin ist wegen seiner fehlenden Doppelbindung nicht planar gebaut und somit kein Phenylalaninantagonist. Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu Leucin wirkt es als Antagonist zu dieser Aminosäure (PAL et al., 1956).

Das bisher ermittelte Wirkungsspektrum von L-2,5-Dihydrophenylalanin umfaßt zahlreiche Vertreter grampositiver und gramnegativer Eubacteriales, der Pseudomonadales, der Hefen und als Vertreter der Actinomycetales Mycobacterium. Dagegen wirkt es nicht auf zahlreiche Arten der Gattung Aspergillus und Penicillium (GENGHOF, 1970). Das breite Wirkungsspektrum ist, wie man aus einer vergleichenden Untersuchung der Regulation der aromatischen Aminosäuren bei Mikroorganismen folgern kann, darauf zurückzuführen, daß die aromatischen Aminosäuren jeweils an der Regulation ihrer Biosynthese beteiligt

sind (JENSEN und NASSER, 1967; JENSEN et al., 1967). Der Regulationstyp ist aber nicht einheitlich; neben Isoenzym-Feedback-Hemmung kommen hauptsächlich noch sequentielle (JENSEN und NESTER, 1965 und 1966a , b; NESTER et al., 1969) und kumulative Feedback-Hemmung vor (WOOLFOLK und STADTMAN, 1964; JENSEN et al., 1967).

Im Zusammenhang mit dem Wirkungsspektrum ist interessant, daß man bei den bisher untersuchten Streptomyces-Arten keine Regulation der DAHP-Synthetase durch Phenylalanin und Tyrosin gefunden hat (NASSER et al., 1967; WESTLAKE und VINING, 1969). Dagegen bewirkt Tryptophan bei einigen Streptomyces-Arten eine Hemmung dieses Enzyms bis zu 50 %. Wie bei Streptomyces aureofaciens festgestellt wurde, wirkt auch L-2,5-Dihydrophenylalanin nicht hemmend auf die DAHP-Synthetase (GÖRISCH, persönliche Mitteilung). Dies ist sehr wahrscheinlich eine Erklärung dafür, daß das Antibiotikum keine hemmende Wirkung auf seinen Produzenten hat.

Neben L-2,5-Dihydrophenylalanin gibt es noch ein weiteres Antibiotikum, das Ketomycin, das als Antimetabolit in die Biosynthese von Aminosäuren eingreift (KELLER-SCHIERLEIN et al., 1969). Ketomycin (Cyclohexenylglyoxylsäure) hemmt kompetitiv die Aminosäure-Dehydrogenase, die Keto-ß-methylvalerat in Isoleucin umwandelt; 3-Cyclohexenylglycin, ein Umwandlungsprodukt von Ketomycin, hemmt die Aktivität der Threoninindesaminase. Alle anderen bekannten, natürlich vorkommenden Aminosäureanalogen greifen, soweit ihre Wirkungsweise untersucht worden ist, entweder in die Purinbiosynthese oder in die Synthese der bakteriellen Zellwand ein (Tab. 10). Die beiden Leucin-Antagonisten der Tabelle 10 könnten in Analogie zu L-2,5-Dihydrophenylalanin und Ketomycin die Regulation der Leucin-Biosynthese beeinflussen. Ein Hinweis dafür ist auch die Wirkungsweise der α-Aminobuttersäure. Die angeführten Aminosäureantagonisten werden bis auf das Hadacidin, das von verschiedenen Penicillium-Arten gebildet wird, sämtlich von Streptomyceten produziert.

Tab. 10: Natürlich vorkommende Aminosäure-Antagonisten und ihr Wirkungsort

Aminosäure-antagonist	zugehöriger Metabolit	Wirkungs-ort	Literatur
D-Cycloserin	D-Alanin	Zellwand	
o-Carbamyl-D-serin	D-Alanin	Zellwand	TANAKA, 1963
DON	Glutamin	Purinbio-synthese	PITTILO und HUNT, 1967
Azaserin	Glutamin	Purinbio-synthese	PITTILO und HUNT, 1967
Hadacidin	L-Asparagin-säure	Adenosyl-5-phosphat-Synthese	SHIGEURA, 1967
Dichlor-α-amino-Buttersäure	Leucin	unbekannt	ARGOUDELIS et al., 1967
α-amino-Butter-säure (synthe-tisch)	Isoleucin und Valin	Acetohydro-xysäure-synthase	FREUNDLICH und CLARKE, 1968
2-amino-3-Di-methylamino-propionsäure	Leucin	unbekannt	ARGOUDELIS et al., 1967
Alanosin	Asparagin- u. Glutaminsäure		MURTHY et al., 1966; GALE u. SCHMIDT, 1968
Cyclohexenyl-glycin (Umwandlungs-produkt von Ketomycin)	Isoleucin	Threonin des-aminase	KELLER-SCHIER-LEIN et al., 1969)

V. Zusammenfassung

Aus den Kulturfiltraten von Streptomyces parvulus (Stamm Tü 64) und Streptomyces arenae (Stamm Tü 109) wurde ein hydrophiles Antibiotikum durch Adsorption an Aktivkohle, Eluierung und anschließender Craig-Verteilung isoliert. Aufgrund seiner ermittelten chemischen und physikalischen Eigenschaften handelt es sich um die Aminosäure L-2,5-Dihydrophenylalanin.

L-2,5-Dihydrophenylalanin hemmt bei Zugabe in der lag-Phase das Wachstum von E. coli K 12 in definiertem, flüssigem Medium bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ M (8,35 γ/ml). Die Hemmwirkung wird von Phenylalanin unkompetitiv und von Tyrosin kompetitiv aufgehoben.

Mutanten, die resistent sind gegen 10^{-3} M DL-p-Fluorphenylalanin zeigen Kreuzresistenz gegen L-2,5-Dihydrophenylalanin.

Die bakteriostatische Wirkung von L-2,5-Dihydrophenylalanin auf E. coli K 12 beruht darauf, daß es ähnlich wie p-Fluorphenylalanin als Phenylalanin-Antimetabolit in die Regulation der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren eingreift.

L-2,5-Dihydrophenylalanin hemmt die Aktivität des Phe-sensitiven Isoenzyms der DAHP-Synthetase bei einer Konzentration von 10^{-3} M zu 72 %. Die Aktivität der Prephenatdehydratase wird bei dieser Konzentration zu 66 % gehemmt.

Bei Zugabe von $5 \cdot 10^{-5}$ M L-2,5-Dihydrophenylalanin zum Kulturmedium von E. coli K 12 wird die Bildung der DAHP-Synthetase zu 30 % reprimiert.

Ein möglicher Einbau von L-2,5-Dihydrophenylalanin ins Protein wird diskutiert.

VI. Literaturverzeichnis

AKIBA, T., K. KOYAMA, Y. ISSHIKI, S. KIMURA und T. FUKUSHIMA: Studies on mechanism of development of multiple drug-resistant Shigella strains. Nippon Iji Shimpo 1866, 46 (1960); ref. von Sugino, Y. und Y. Hirota: Conjugal fertility associated with resistance factor R in Escherichia coli. J. Bacteriol. 84, 902 - 910 (1962)

ARGOUDELIS, A. D., R. R. HERR, D. J. MASON, T. R. PYKE und J. F. ZIESERL: New amino acids from Streptomyces. Biochemistry 6, 165 - 170 (1967)

BAILEY, J. L.: "Techniques in protein chemistry." 2. Aufl. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York (1967)

BAKER, T. I. und I. P. CRAWFORD: Anthranilate synthetase. Partial purification and some kinetic studies on the enzyme from Escherichia coli. J. Biol. Chem. 241, 5577 - 5584 (1966)

BALLOU, C. E., H. O. L. FISCHER und D. L. MAC DONALD: The synthesis and properties of D-erythrose 4-phosphate. J. Amer. Chem. Soc. 77, 5967 - 5970 (1955)

BROWN, K. D.: Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in Escherichia coli K 12. Genetics 60, 31 - 48 (1968)

BROWN, K. D. und C. H. DOY: End-product regulation of the general aromatic pathway in Escherichia coli W. Biochim. Biophys. Acta 77, 170 - 172 (1963)

BROWN, K. D. und C. H. DOY: Control of three isoenzymic 7-phospho-2-oxo-3-deoxy-D-arabino-heptonate-D-erythrose-4-phosphate lyases of Escherichia coli W and derived mutants by repressive and "inductive" effects of the aromatic amino acids. Biochim. Biophys. Acta 118, 157 - 172 (1966)

BROSTROM, A. M. und S. B. BINKLEY: Membrane alteration and the formation of metachromatic granules in Escherichia coli treated with p-fluorophenylalanine. J. Bacteriol. 98, 1263 - 1270 (1969a)

BROSTROM, A. M. und S. B. BINKLEY: Synchronous growth of Escherichia coli after treatment with p-fluorophenylalanine. J. Bacteriol. 98, 1271 - 1273 (1969b)

BRUNNER, R. und G. MACHEK: "Die Antibiotica", Bd. II. "Die mittleren Antibiotica". Verlag Hans Carl, Nürnberg (1965)

BÜCHER, T. und H. SIES: "Inhibitors - tools in cell research". 20. Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie, 14. - 16. April 1969 in Mosbach/Baden. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1969)

BUZZETTI, F., E. GÄUMANN, R. HÜTTER, W. KELLER-SCHIERLEIN, L. NEIPP, V. PRELOG und H. ZÄHNER: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 41. Mitteilung. Manumycin. Pharmaceutica Acta Helvetiae 38, 871 - 874 (1963)

CARPENTER, C. und S. B. BINKLEY: Effect of p-Fluorphenylalanine on chromosome replication in Escherichia coli. J. Bacteriol. 96, 939 - 949 (1968)

CHANDRA, P. und L. C. VINING: Conversion of phenylalanine to tyrosine by microorganisms. Can. J. Microbiol. 14, 573 - 578 (1968)

CHAPMAN, P. J. und S. DAGLEY: Bacterial oxidation of phenylalanine and phenylacetic acid. Biochem. J. 75, 6 (1960)

COHEN, G. N.: Regulation of enzyme activity in microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 19, 105 - 126 (1965)

COOPER, K. E.: The theory of antibiotic inhibition zones. In: "Analytical Microbiology", 1 - 86, F. Kavanagh (ed.), Academic Press, New York und London (1963)

COTTON, R. G. H. und F. GIBSON: The biosynthesis of phenylalanine and tyrosine; enzymes converting chorismic acid into prephenic acid and their relationship to prephenate dehydratase and prephenate dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta 100, 76 - 88 (1965)

DAVIS, B. D. und E. S. MINGIOLI: Mutants of Escherichia coli requiring methionine or vitamin B 12. J. Bacteriol. 60, 17 - 28 (1950)

DIXON, M. und E. C. WEBB: "Enzymes". 2. Aufl., Longmans, London (1964)

DOY, C. H.: Tryptophan as an inhibitor of 3-deoxy-arabino-heptulosonate 7-phosphate-synthetase. Biochim. Biophys. Res. Commun. 26, 187 - 192 (1967)

DOY, C. H.: Control of aromatic biosynthesis particular with regard to the common pathway and the allosteric enzyme, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate-synthetase. Rev. Pure Appl. Chem. 18, 41 - 78 (1968)

DOY, D. H. und K. D. BROWN: Control of aromatic biosynthesis: the multiplicity of 7-phospho-2-oxo-3-deoxy-D-arabino-heptonate-D-erythrose-4-phosphate-lyase (pyruvate phosphorylating) in Escherichia coli W. Biochem. Biophys. Acta 104, 377 - 389 (1965)

DUDA, E., M. STAUB, P. VENETIANER und G. DENES: Interaction between phenylalanine-tRNA and the allosteric first enzyme of the aromatic amino acid biosynthetic pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 992 - 997 (1968)

EDWARDS, J. M. und L. M. JACKMAN: Chorismic acid. A branch point intermediate in aromatic biosynthesis. Australian J. Chem. 18, 1227 (1965)

EIDLIC, L. und F. C. NEIDHARDT: Role of valyl-sRNA synthetase in enzyme repression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 53, 539 - 543 (1965)

EZEKIEL, D. H.: False feedback inhibition of aromatic amino acid biosynthesis by ß-2-thienylalanine. Biochim. Biophys. Acta 95, 54 - 62 (1965)

FEWSTER, J. A.: Phosphorylation of shikimic acid by ultrasonic extracts of micro-organisms. Biochem. J. 85, 388 - 393 (1962)

FRADEJAS, R. G., J. M. RAVEL und W. SHIVE: The control of shikimic acid synthesis by tyrosine and phenylalanine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 5, 320 - 323 (1961)

FREUNDLICH, M.: Valyl-transfer RNA: role in repression of the isoleucine-valine enzymes in Escherichia coli. Science 157, 828 - 829 (1967)

FREUNDLICH, M. und L. P. CLARKE: Control of isoleucine, valine and leucin biosynthesis. V. Dual effect of -amino-butyric acid on repression and endproduct inhibition in Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 170, 271 - 281 (1968)

FURIA, T. E.: "Handbook of Food Additives". Chemical Rubber Co., Cleveland und Ohio (1968)

GALE, G. R. und G. B. SCHMIDT: Mode of action of alanosine. Biochem. Pharmacol. 17, 363 - 368 (1968)

GENGHOF, D. S.: 2,5-Dihydrophenylalanine as an inhibitor of microbial growth. Can. J. Microbiol. 16, 545 - 547 (1970)

GIBSON, F.: Chorismic acid: purification and some chemical and physical studies. Biochem. J. 90, 256 - 261 (1964)

GIBSON, M. I. und F. GIBSON: A new intermediate in aromatic biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 65, 160 - 163 (1962)

GIBSON, M. I. und F. GIBSON: Preliminary studies on the isolation and metabolism of an intermediate in aromatic biosynthesis: chorismic acid. Biochem. J. 90, 248 - 256 (1964)

GIBSON, F. und J. PITTARD: Pathways of biosynthesis of aromatic amino acids and vitamins and their control in microorganisms. Bacteriol. Rev. 32, 465 - 492 (1968)

GOTTLIEB, D. und P. D. SHAW: "Antibiotics". Vol. I. "Mechanism of action". Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1967)

GÖRISCH, H.: Persönl. Mitteilung. Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Universität Hohenheim, Stuttgart

HARDY, C. und S. B. BINKLEY: Effect of p-fluorphenylalanine on nucleic acid biosynthesis and cell division in Escherichia coli. Biochemistry 6, 1892 - 1898 (1967)

HECKER, E.: "Verteilungsverfahren im Laboratorium". Verlag Chemie GmbH, Weinheim (1955)

HÜTTER, R.: "Systematik der Streptomyceten unter besonderer Berücksichtigung der von ihnen gebildeten Antibiotica". S. Karger, Basel (1967)

ITO, J. und I. P. CRAWFORD: Regulation of the enzyme of the tryptophan pathway in Escherichia coli. Genetics 52, 1303 - 1316 (1965)

JANACEK, J. und H. V. RICKENBERG: The incorporation of ß-2-thienyl-alanine into the ß-galactosidase of Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 81, 108 - 121 (1964)

JENSEN, R. A. und D. S. NASSER: Comparative regulation of isoenzymic 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetases in microorganisms. J. Bacteriol. 95, 188 - 196 (1968)

JENSEN, R. A., D. S. NASSER und E. W. NESTER: Comperative control of a branch-point enzyme in microorganisms. J. Bacteriol. 94, 1582 - 1593 (1967)

JENSEN, R. A. und E. W. NESTER: The regulatory significance of intermediary metabolites: Control of aromatic acid biosynthesis by feedback inhibition in Bacillus subtilis. J. Molec. Biol. 12, 468 - 481 (1965)

JENSEN, R. A. und E. W. NESTER: Regulatory enzymes of aromatic amino acid biosynthesis in Bacillus subtilis. I. Purification and properties of 3-deoxy-D-arabino-heptulo-sonate 7-phosphate synthetase. J. Biol. Chem. 241, 3365 - 3372 (1966a)

JENSEN, R. A. und E. W. NESTER: Regulatory enzymes of aromatic amino acid biosynthesis. II. The enzymology of feedback inhibition of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase. J. Biol. Chem. 241, 3373 - 3380 (1966b)

JOCKUSCH,H . und H. G. WITTMANN: Entschlüsselung des genetischen Codes. Umschau 2, 49 - 55 (1966)

KELLER-SCHIERLEIN, W., K. PORALLA und H. ZÄHNER: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 78. Mitteilung. Isolierung, Identifizierung und Wirkungsweise von Ketomycin [(R)-3-Cyclohexenylglyoxylsäure] und dessen Umwandlungsprodukt 3-Cyclohexenylglycin. Arch. Mikrobiol. 67, 339 - 356 (1969)

LAYNE, E.: Spectrophotometric and turbimetric methods for measuring proteins. In: "Methods in Enzymology", Vol. III, 447, S. P. Colowick und N. O. Kaplan (eds.), Academic Press, New York und London (1957)

LEBEK, G.: Die infektiöse, bakterielle Antibiotika-Resistenz. Verlag Hans Huber, Bern und Stuttgart (1969)

LINGENS, F.: Die Biosynthese aromatischer Aminosäuren und deren Regulation. Angew. Chem. 80, 384 - 394 (1968)

LINGENS, F., W. GOEBEL und H. UESSELER: Regulation der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren in Claviceps paspali. European J. Biochem. 2, 442 - 447 (1967)

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

MILLER, D. A. und S. SIMMONDS: Phenylalanine and tyrosine metabolism in E. coli strain K 12. Science 126, 445 - 446 (1957)

MITOMA, C. und L. C. LEEPER: Enzymic conversion of phenylalanine to tyrosine. Federation Proc. 13, 266 (1954)

MOYED, B. S.: Biochemical mechanisms of drug resistance. Ann. Rev. Microbiol. 18, 347 - 366 (1964)

MUNIER, R. und G. N. COHEN: Incorporation d'analogues structuraux d'aminoacids dans les proteines bacteriennes. Biochim. Biophys. Acta 21, 592 - 593 (1956)

MÜLLER, A.: Siderochrome aus Mikroorganismen. Dissertation Universität Tübingen (1968)

MURTHY, Y. K. S., J. E. THIEMANN, C. CORONELLI und P. SENSI: Alanosine, a new antiviral and antitumor agent isolated from a Streptomyces. Nature 211, 1198 - 1199 (1966)

NASS, G., K. PORALLA und H. ZÄHNER: Effect of antibiotic borrelidin on the regulation of threonine biosynthetic enzymes in E. coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, 84 - 91 (1969)

NESTER, E. W., R. A. JENSEN und D. NASSER: Regulation of enzyme synthesis in the aromatic amino acid pathway of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 97, 83 - 90 (1969)

NEWTON, B. A. und P. E. REYNOLDS: "Biochemical studies of antimicrobial drugs". University Press, Cambridge (1966)

OCHIAI, K.: Distribution and clinic of dysentery caused by antibiotic-resistant strains. Medicine of Japan in 1959. Proc. 15th Gen. Meeting Japan Med. Assoc. 5, 306 (1959); ref. von Watanabe, T., Bact. Rev. 27, 87 - 115 (1963)

PAL, P. R., C. G. SKINNER, R. L. DENNIS und W. SHIVE: Cyclopentane-alanine and 1-cyclopentene-1-alanine, inhibitory analogs of leucine and phenylalanine. J. Amer. Chem. Soc. 78, 5116 (1956)

PARK, S. T.: Inhibition of cell-wall synthesis in Staphylococcus aureus by chemicals which cause accumulation of wall precursors. Biochem. J. 70, 2 (1958)

PATAKI, G.: "Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie". W. de Gruyter u. Co., Berlin (1966)

PARTHIER, B.: Wirkungsmechanismen und Wirkungsspektren der Antibiotika im Protein- und Nukleinsäurestoffwechsel. Pharmazie 20, 465 - 490 (1965)

PIPERNO, J. R. und D. L. OXENDER: Amino acid transport systems in Escherichia coli K 12. J. Biol. Chem. 243, 5914 - 5920 (1968)

PITTARD, J., J. CAMAKARIS und B. J. WALLACE: Inhibition of 3-deoxy-D-arabinoheptulosonic acid 7-phosphate synthetase (trp) in Escherichia coli. J. Bacteriol. 97, 1242 - 1249 (1969)

PITTILO, R. F. und P. E. HUNT: Azaserine and 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucine (DON) in: "Antibiotics I. Mechanism of action", 481 - 493; Gottlieb, D. und P. D. Shaw (eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1967)

PORALLA, K.: Zur Wirkungsweise des makrolidartigen Antibiotikums Borrelidin und typischer Makrolid-Antibiotika. Dissertation Universität Tübingen (1967)

PREVIC, E. P. und S. B. BINKLEY: Repression and inhibition of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthetase by p-fluorphenylalanine in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 162 - 166 (1964a)

PREVIC, E. P. und S. B. BINKLEY: Slow exponential growth of Escherichia coli in the presence of p-fluorophenylalanine: effect of the analogue on aromatic biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 87, 277 - 290 (1964b)

RAVEL, J. M., M. N. WHITE und W. SHIVE: Activation of tyrosine analogues in relation to enzyme repression. Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 352 - 359 (1965)

REINER, J. M.: "Behavior of Enzyme Systems", 2. Aufl.. Van Nostrand Reinhold Company, New York-Toronto-London-Melbourne (1969)

ROTH, J. R. und B. N. AMES: Histidine regulatory mutants in Salmonella typhimurium. II. Histidine regulatory mutants having altered histidyl-t-RNA-synthetase. J. Mol. Biol. 22, 325 - 334 (1966)

SAHM, H.: Untersuchungen zur Tryptophan-Bildung bei Escherichia coli K 12. Dissertation Universität Tübingen (1970)

SCHEPARTZ, B.: Assay of tyrosine transaminase. Anal. Biochem. 30, 443 - 448 (1969)

SCHLESINGER, S. und B. MAGASANIK: Effect of α-methylhistidine on the control of histidine synthesis. J. Mol. Biol. 9, 670 - 682 (1964)

SCHLESINGER, S. und M. J. SCHLESINGER: The effect of amino acid analogues on alkaline phosphatase formation in Escherichia coli K 12. III. Substitution of 2-methylhistidine for histidine. J. Biol. Chem. 244, 3803 - 3809 (1969)

SCHWINCK, I. und E. ADAMS: Aromatic biosynthesis. XVI. Aromatization of prephenic acid to p-hydroxyphenylpyruvic acid, a step in tyrosine biosynthesis in Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 36, 102 - 117 (1959)

SHIGEURA, T. H.: Hadacidin. In: "Antibiotics I. Mechanism of action", 451 - 456; Gottlieb, D. und P. D. Shaw (eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1967)

SHIVE, W. und C. G. SKINNER: Amino acid analogues. In: "Metabolic inhibitors", 2- 58; Hochster, R. M. und J. H. Quastel (eds.); Academic Press, New York (1967)

SHOULDERS, B. A., R. M. GIPSON, R. J. JANDACEK, S. H. SIMONSEN und W. SHIVE: Conformation and biological activity of 1,4-cyclohexadiene derivates. J. Amer. Chem. Soc. 90, 2992 - 2993 (1968)

SILBERT, D. F., S. E. JORGENSON und E. C. C. LIN: Repression of transaminase A by tyrosine in Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 73, 232 - 240 (1963)

SMITH, L. C., J. M. RAVEL, S. R. LAX und W. SHIVE: The control of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthesis by phenylalanine and tyrosine. J. Biol. Chem. 237, 3566 - 3570 (1962)

SMITH, L. C., J. M. RAVEL, S. R. LAX und W. SHIVE: The effects of phenylalanine and tyrosine analogues on the synthesis and activity of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthetases. Arch. Biochem. Biophys. 105, 424 - 430 (1964)

SNOW, M. C., C. LAUINGER und C. RESSLER: 1,4-cyclohexadiene-1-alanine (2,5-dihydrophenylalanine), a new inhibitor of phenylalanine for the Rat and Leuconostoc dextranicum 8086. J. Org. Chem. 33, 1774 - 1780 (1968)

SOMMERVILLE, R. L. und C. YANOFSKY: Studies on the regulation of tryptophan biosynthesis in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 11, 747 - 759 (1965)

SPRINSON, D. B., P. R. SRINIVASON und M. KATAGIRI: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthetase from Escherichia coli. In: "Methods of enzymology", Vol. V, 394 - 398; Colowick, S. P. und N. O. Kaplan (eds.), Academic Press, New York und London (1962)

SPRÖSSLER, B. und F. LINGENS: Chorismat-Mutase aus Claviceps. I. Eigenschaften der Chorismat-Mutase aus verschiedenen Claviceps-Stämmen. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 448 - 458 (1970)

SRINIVASON, P. R. und D. B. SPRINSON: 2-keto-3-deoxy-D-arabino-heptonic acid 7-phosphate synthetase. J. Biol. Chem. 234, 716 - 722 (1959)

SRINIVASON, P. R., J. ROTHSCHILD und D. B. SPRINSON: The enzymic conversion of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate to 5-dehydroquinate. J. Biol. Chem. 238, 3176 - 3182 (1963)

STADTMAN, E. R.: Symposium on multiple forms of enzymes and control mechanisms. II. Enzyme multiplicity and function in the regulation of divergent metabolic pathways. Bacteriol. Rev. 27, 170 - 181 (1963)

STADTMAN, E. R.: Allosteric regulation of enzyme activity. Advanc. Enzymol. 28, 41 - 154 (1966)

STAHL, E.: "Dünnschichtchromatographie". 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1967)

STAUB, M. und G. DENES: Purification and properties of the 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase (phenylalanine sensitive) of Escherichia coli K 12. I. Purification of enzyme and some of its catalytic properties. Biochim. Biophys. Acta 178, 588 - 598 (1969a)

STAUB, M. und G. DENES: Purification and properties of the 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase (phenylalanine sensitive) of Escherichia coli K 12. II. Inhibition of activity of the enzyme with phenylalanine and functional group-specific reagents. Biochim. Biophys. Acta 178, 599 - 608 (1969b)

TANAKA, N.: Mechanism of action of O-carbamyl-D-serine, a new member of cell wall inhibitors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 68 - 71 (1963)

WALLACE, B. J. und J. PITTARD: Genetic and biochemical analysis of the isoenzymes concerned in the first reaction of aromatic biosynthesis in Escherichia coli. J. Bacteriol. 93, 237 - 244 (1967a)

WALLACE, B. J. und J. PITTARD: Chromatography of DAHP synthetase (trp) on DEAE cellulose: A correction. J. Bacteriol. 94, 1279 (1967b)

WALLACE, B. J. und J. PITTARD: Regulator gene controlling enzymes concerned in tyrosine biosynthesis in Escherichia coli. J. Bacteriol. 97, 1234 - 1241 (1969a)

WALLACE, B. J. und J. PITTARD: Regulation of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid synthetase activity in relation to the synthesis of the aromatic vitamins in Escherichia coli K 12. J. Bacteriol. 99, 707 - 712 (1969b)

WALTER, A. M. und L. HEILMEYER: "Antibiotika-Fibel", 3. Aufl., Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1969)

WARBURG, O. und W. CHRISTIAN: Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. Biochem. Z. 310, 384 - 421 (1941)

WATANABE, T.: Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bact. Rev. 27, 87 - 115 (1963)

WEBB, J. L.: "Enzyme and metabolic inhibitors. Vol. I. General principles of inhibition." Academic Press, New York (1963)

WESTLAKE, D. W. S. und L. C. VINING: Biosynthesis of chloramphenicol. Biotech. Bioeng. 11, 1125 - 1134 (1969)

WOOLFOLK, C. A. und E. R. STADTMAN: Cumulative feedback inhibition in the multiple end product regulation of glutamine synthetase activity in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 313 - 319 (1964)

WOOLLEY, D. W.: A study of antimetabolites; Wiley, New York (1952)

YOUNG, I. G., F. GIBSON und C. G. MAC DONALD: Enzymic and non-enzymic transformations of chorismic acid and related cyclohexadiens. Biochim. Biophys. Acta 192, 62 - 72 (1969)

ZÄHNER, H.: "Biologie der Antibiotica". Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1965)

ZÄHNER, H., R. HÜTTER und E. BACHMANN: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 23. Mitteilung. Zur Kenntnis der Sideromycinwirkung. Arch. Mikrobiol. 36, 325 - 345 (1960)

L e b e n s l a u f

Am 31.5.1943 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Karl Fickenscher und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Kreft, in Köln geboren.

Von 1949 bis 1953 besuchte ich die Volksschule in Münchberg/Obfr., von 1953 an die dortige Oberrealschule, wo ich 1962 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1962/63 begann ich an der Universität Köln mit dem Studium der Biologie und Chemie. Im Wintersemester 1966/67 legte ich die Allgemeine Prüfung in Philosophie und Pädagogik und im Wintersemester 1967/68 das Staatsexamen für das Lehramt an höheren Schulen in den Hauptfächern Biologie und Chemie ab.

Im Sommersemester 1968 begann ich am Institut für Biologie, Lehrbereich Mikrobiologie, der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner mit der Durchführung der vorliegenden Dissertation: "Isolierung und Wirkungsweise von L-2,5-Dihydrophenylalanin, ein Antibiotikum aus Streptomyceten".

Meine akademischen Lehrer waren

in Köln

Biologie und Biochemie	C. Bresch, M. Delbrück, A. Egelhaaf, H. Engländer, K. Esser, U. Henning, D. Heß, F. Huber, O. Kuhn, W. Menke, K. Napp-Zinn, P. Starlinger, J. Straub, H. Stubbe und H. G. Zachau
Chemie und Physik	M. Baudler, F. Fehér, J. Jaumann, F. Kirchner, T. Kruck, G. Schmid und E. Vogel
Philosophie und Pädagogik	H. H. Groothoff, L. Landgrebe, K. H. Volkmann-Schluck und P. Wilpert

in Tübingen

E. Bünning, F. Bonhoeffer, H. Friedrich-Freksa, W. Löffler, H. Machleidt und H. Zähner